ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER SESQUITERPENLACTONE AUS DEN BLÜTENKÖRBCHEN VON ARNICA MONTANA L.

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Peter-Michael Röttger
aus Berlin

Düsseldorf
1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0021

Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von Arnica montana L.

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Peter-Michael Röttger
aus Berlin

Düsseldorf
1981

Dekan	: Professor Dr. W. Peters
Referent	: Professor Dr. G. Willuhn
Korreferent	: Professor Dr. H. Möhrle
Tag der mündlichen Prüfung	: 17-12-1981

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn im Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf ausgeführt.

Meinem Lehrer und Doktorvater

Herrn Professor Dr. G. Willuhn

danke ich herzlich für seine hilfreiche Betreuung meiner Arbeit, für die mir zuteil gewordene Unterstützung und Förderung sowie für die mir entgegengebrachte Großzügigkeit.

Traudl und Karl Murr
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung und Problemstellung	1
B.	Zur Chemie der Sesquiterpenlactone	7
C.	Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von Arnica montana L.	
I.	Gewinnung der Sesquiterpenlacton - Fraktion	
	1. Herstellung der Extrakte	
	2. DC - Analyse der hergestellten Extrakte	
	2.1. Detektion der Sesquiterpenlactone	
	2.2. DC - Auftrennung der Extrakte	
II.	Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone	
	1. Fraktionierung des S1 - Extraktes A	
	2. Isolierung und Identifizierung von Helenalin-2-methylbuttersäureester und Helenalinisovaleriansäureester	20
	2.1. GC/MS - Analyse und Reindarstellung durch präparative HPLC	20
	2.2. Identifizierung von Helenalin-2-methylbuttersäureester	
	2.3. Identifizierung von Helenalinisovaleriansäureester	
	3. Isolierung und Identifizierung von Helenalinisobuttersäure-, -α-methacrylsäure- und -tiglinsäureester	23
	3.1. GC/MS - Analyse	
	3.2. Isolierung und Identifizierung von Helenalinisobuttersäureester	
	3.3. Identifizierung von Helenalin-α-methacrylsäureester	36

Seite

3.4. Identifizierung von Helenalintiglinsäureester 38

4. Isolierung und Identifizierung von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester und 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester 42

4.1. GC/MS - Analyse und Reindarstellung durch präparative HPLC 42

4.2. Identifizierung von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester 46

4.3. Identifizierung von 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester 50

5. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalinisobutter-, -α-methacryl- und -tiglinsäureester 57

5.1. GC und GC/MS - Analyse der gereinigten Teilfraktion VII 57

5.2. GC - Identifizierung der Säurekomponenten der 11,13-Dihydrohelenalinester 59

5.3. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalinisobuttersäureester 61

5.4. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureester 62

6. Isolierung und Identifizierung von Helenalinessigsäureester 66

7. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalinessigsäureester 68

8. Identifizierung von Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin 69

III. Fragmentierungsmuster von Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinestern im Massenspektrum in Abhängigkeit von ihren Säurekomponenten 71

Seite

IV. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydro- 78
helenalinisovaleriansäureester aus den Blüten von
A. montana spanischer Herkunft

1. DC - Vergleich verschiedener Herkünfte von 78
Arnikablüten

2. Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenaliniso- 81
valeriansäureester

3. Isolierung eines weiteren Sesquiterpenlactons 87
aus den Blütenkörbchen von A. montana spanischer Herkunft

D. Untersuchungen zur Wirkung der Sesquiterpenlactone 100
aus Arnica montana L.

1. Bestimmung der LD_{50} der Sesquiterpenlacton- 100
fraktion aus Arnikablüten

2. Beeinflussung der Hexobarbitalschlafzeit durch 103
die Sesquiterpenlacton-Gesamtfraktion

3. Die Wirkung von Helenalinacetat auf die Herz- 105
tätigkeit

3.1. Die Wirkung von Helenalinacetat auf den spontan 105
schlagenden rechten Vorhof

3.2. Die Wirkung von Helenalinacetat auf den elek- 108
trisch gereizten linken Vorhof

4. Untersuchung der Herzwirkung von Helenalinacetat 110
an der isolierten Muskelfaser

5. Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität 112
von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat

E. Diskussion der Ergebnisse 117

F. Zusammenfassung 134

Seite

G. Experimenteller Teil 138

1. Herkunft der Drogen 138

2. Spektroskopische Methoden 138

3. Bestimmung der physikalischen Konstanten 139

4. Chromatographische Methoden 139

4.1. Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren 139

4.2. Säulenchromatographie 141

4.3. Gaschromatographie 142

4.4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie 144

5. Isolierung der Sesquiterpenlactone 146

5.1. Gewinnung der Sesquiterpenlactonfraktionen 146

5.2. Fraktionierung der S1 - Gesamtfraktion 148

5.3. Isolierung der Sesquiterpenlactone 148

5.3.1. SC der Teilfraktionen III, IV, V und VII 148

5.3.2. Isolierung von Helenalin-2-methylbuttersäure- und Helenalinisovaleriansäureester 150

5.3.3. Isolierung des Isobuttersäure-, α-Methacrylsäure- und Tiglinsäureesters von Helenalin 150

5.3.4. Isolierung von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester und 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester 151

5.3.5. Alkalische Hydrolyse der 11,13-Dihydrohelenalinester 152

5.3.6. Isolierung des Isobuttersäure- und Tiglinsäureesters von 11,13-Dihydrohelenalin 152

5.3.7. Isolierung von Helenalinessigsäureester 153

5.3.8. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalinessigsäureester 153

Seite

5.3.9. Acetylierung der Teilfraktion XII 154

6. Herstellung der S1 - Extrakte zum DC - Vergleich von Arnikablüten verschiedener Herkünfte 154

7. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester und eines unbekannten Sesquiterpenlactonisovaleriansäureesters aus Arnikablüten spanischer Herkunft 156

7.1. Herstellung und Fraktionierung des S1 - Extraktes 156

7.2. Isolierung des Isovaleriansäureesters von 11,13-Dihydrohelenalin und eines unbekannten Sesquiterpenlactons 156

8. Synthese der Isovaleriansäure-, Isobuttersäure- und Tiglinsäureester von Helenalin 157

9. Darstellung von Angelicasäure 157

10. Herstellung des S1 - Extraktes zur Bestimmung der LD_{50} und der Hexobarbitalschlafzeit 159

11. Versuchsanordnung für die Untersuchung der Herzwirkung von Helenalinacetat 159

12. Testorganismen, Nährmedien und Methode der antibiotischen Testversuche 161

H. Literaturverzeichnis 165

A. Einleitung und Problemstellung

Die Asteraceae Arnica montana L. gehört zu den wenigen Arzneipflanzen, deren lateinischer Name "Arnica" volkstümlicher ist als die deutsche Bezeichnung "Bergwohlverleih". Dies ist bereits ein Hinweis auf die breite medizinische Anwendung, die diese Pflanze in der Volksheilkunde erfahren hat. Seit dem 16. Jahrhundert ist sie in den Aufzeichnungen und Beschreibungen der Botaniker und Mediziner als vielseitig verwendetes Externum und Internum zu finden (DUQUENOIS, 1971). In die Schulmedizin wurde die Pflanze erst im 18. Jahrhundert eingeführt, wobei zunächst unterirdische und oberirdische Organe durchaus den gleichen Rang einnahmen. Hier hat sich ein gewisser Wandel dahingehend vollzogen, daß heute vorwiegend die Blüten und Blütenkörbchen therapeutisch genutzt werden. Sie sind außer im DAB 8 in 13 weiteren Pharmakopoeen zu finden. Wurzeln und Rhizome der Pflanze werden nur noch von 3 Pharmakopoeen und von der amtlichen Ausgabe des Homöopathischen Arzneibuches (HAB 1, 1978) geführt. Als einziges Arzneibuch enthält das italienische eine Monographie über "Blüten und Rhizome der Arnica".

Ein Wandel hat sich ebenfalls in der Art der Anwendung vollzogen. In früherer Zeit stand die innerliche Verwendung in Form von alkoholischen Auszügen im Vordergrund. Die Mazerate dienten in erster Linie als Herz- und Kreislaufmittel, mit denen gleichzeitig eine atemanaleptische Wirkung erzielt wurde (GEßNER, 1949). Jedoch

werden auch Anwendungen beschrieben, die auf eine antirheumatische, diuretische oder cholagoge Wirkung hinauslaufen. Schließlich ist die innerliche Verwendung als wehentreibendes Mittel zu nennen, die zu einem Mißbrauch der Pflanze als Abortivum führte. Hauptsächlich bei dieser mißbräuchlichen Anwendung ist es zu den beschriebenen Vergiftungsfällen gekommen, die bisweilen einen letalen Verlauf nahmen (SCHELENZ, 1938; SCHOENEMANN, 1938; MENGE, 1953).

Heute steht die Verwendung der Arnica als Externum im Vordergrund der Therapie. Weit über die Hälfte der zahlreichen, in der Roten Liste 1980 aufgeführten Präparate mit Arnicaauszügen sind für den äußerlichen Gebrauch bestimmt. Die Indikationen sind hierbei weitgehend gleichgeblieben. Die Droge findet Anwendung bei Rheuma, Verstauchungen, Verletzungen, Insektenbissen sowie Wunden. Hierbei wird auf die im Schrifttum immer wieder hervorgehobene antiphlogistische, antiseptische und bakteriostatische sowie granulationsbeschleunigende Wirkung abgehoben. Als unerwünschte Wirkungen können dabei Irritationen der Haut auftreten, die in Abhängigkeit von der individuellen Empfindlichkeit des Behandelten von einfachen Rötungen bis zu großflächigen Kontaktekzemen reichen. Die Beschreibung dieser Phänomene zieht sich durch die ältere Literatur bis hin zu neueren Untersuchungen, in denen sogar eine Aufnahme der Arnikatinktur in die Sensibilisierungsreihen gefordert wird (BEETZ et al., 1971;

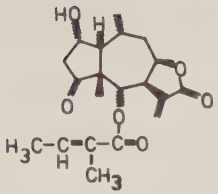
RUDZKI u. GRZYWA, 1977; SCHLEICHER, 1974; HERRMANN, 1978; HAUSEN, 1980). Über die zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen ist am umfangreichsten von FABER (1953) und GEßNER u. ORZECHOWSKI (1974) berichtet worden.

Obwohl die Arnica seit ihrer Einführung in die Schulmedizin fortlaufend intensiv auf ihre chemischen Inhaltsstoffe untersucht worden ist, gehört sie immer noch zu den sogenannten "Problemdrogen", über deren eigentliche Wirkstoffe keine Klarheit herrscht. Zwar sind eine Reihe von Inhaltsstoffen nachgewiesen worden, die mit den beobachteten Wirkungen der Droge in Zusammenhang gebracht werden können, wie das ätherische Öl mit Thymolderivaten, die Flavonoide, Polyacetylene, Kaffeesäurederivate und Cholin, doch reichen diese nicht aus, um die bekannten Wirkungen der Droge zu erklären. Über die bisher gefundenen Inhaltsstoffe liegen neuere Übersichtsarbeiten von LABADIE (1968), DUQUENOIS (1971) und WILLUHN (1973, 1975, 1981) vor.

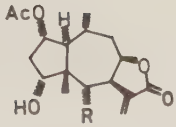
Eine Wende in der ungeklärten Wirkstoffrage dürfte jedoch durch die in neuerer Zeit erfolgte Identifizierung von Sesquiterpenlactonen, den Bitterstoffen der Asteraceen, eingetreten sein. Bei diesen handelt es sich um eine biologisch und pharmakologisch sehr aktive Stoffgruppe. In der Gattung Arnica wurden sie erstmals durch die Isolierung des Pseudoguaianolids Arnifolin (s. Abb. 1) aus Arnica foliosa von einer russischen Arbeitsgruppe nachgewiesen (EVSTRATOVA et al., 1969). Wenig später iso-

lierten POPLAWSKI et al. (1971) aus den Blättern von Arnica montana L. die Pseudoguaianolide Tetrahydrohelenalin und Dihydrohelenalin sowie den Essigsäure-, Isovaleriansäure-, Isobuttersäure- und Methacrylsäureester von Dihydrohelenalin. Die vier Ester erhielten die Bezeichnung Arnicolide A, B, C und D (s. Abb. 1). LIST u. FRIEBEL (1974) arbeiteten dann die Blüten von Arnica montana L. auf und konnten hier als einzige Sesquiterpenlactone Helenalinacetat und ebenfalls Dihydrohelenalinacetat isolieren; HERRMANN et al. (1978) identifizierten zusätzlich den Methacrylsäureester von Helenalin. In Arnica chamissonis ssp. genuina wurden von WILLUHN et al. (1981) zwei neue, als Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid bezeichnete Pseudoguaianolide identifiziert. In den Blüten von Arnica longifolia schließlich wurden neben Helenalin, Helenalinacetat und Dihydrohelenalinacetat als Hauptkomponenten die Xanthanolide Carabron und Xanthalongin gefunden (WILLUHN u. HERRMANN, 1976, 1979).

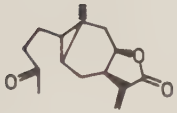
Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigen, daß Helenalin und seine Derivate maßgeblich an den bekannten Arnikawirkungen beteiligt sind (WILLUHN, 1981). Diese Verbindungen wirken cytotoxisch, antitumoral und antibiotisch (u.a. LEE et al., 1972, 1977a,b; HLADON et al., 1975; HALL et al., 1977; OLECHNOWICZ u. STEPIEN, 1963). Sie haben eine starke atemanaleptische Wirkung und sind herz- und kreislaufwirksam (LAMSON, 1913; LIST u. FRIEBEL, 1974; HERRMANN, 1978).



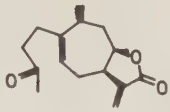
ARNIFOLIN



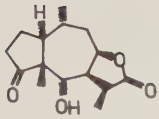
R=H =6-DESOXYCHAMISSONOLID
R=OH= CHAMISSONOLID



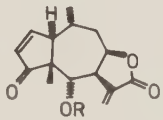
CARABRON



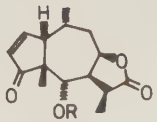
XANTHALONGIN



TETRAHYDRO-
HELENALIN



R= H= HELENALIN
R= ESSIGSÄURE
= HELENALINACETAT
R= α-METHACRYLSÄURE
= HELENALINMETHACRYLAT



R=H =DIHYDROHELENALIN
R=ESSIGSÄURE =ARNICOLID A
R=ISOVALERIANSÄURE = " B
R=ISOBUTTERSÄURE = " C
R=α-METHACRYLSÄURE = " D

Abb. 1 Bisher aus Arnica - Arten identifizierte und isolierte Sesquiterpenlactone

Sie steigern den Uterustonus und verstärken dessen periodische Kontraktionen (RYBALKO et al., 1965; HERRMANN, 1978). Außerdem sind sie für die allergenen Kontaktdermatitiden verantwortlich zu machen (HERRMANN et al., 1978; HAUSEN et al., 1978; HAUSEN, 1980).

WILLUHN u. HERRMANN (1978) konnten zeigen, daß in den Blüten von Arnica montana L. neben den drei bekannten Sesquiterpenlactonen mindestens fünf weitere, noch nicht identifizierte Verbindungen aus dieser Stoffgruppe vorkommen. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Isolierung und Identifizierung dieser Verbindungen. Daneben soll geprüft werden, ob sich Arnikablüten von Pflanzen verschiedener Herkünfte in ihrer Sesquiterpenlactonführung unterscheiden und welche dieser Wirkstoffe in Arnikazubereitungen auftreten. Schließlich sollen Untersuchungen zur Toxizität und zur inotropen Wirkung der Helenalinderivate die Annahme weiter unterstützen, daß die Hauptwirkstoffe der Arnicae flos, DAB 8, in der Stoffgruppe der Sesquiterpenlactone zu suchen sind.

B. Zur Chemie der Sesquiterpenlactone

Die Sesquiterpenlactone sind farblose, amphiphile, meist bitter schmeckende Verbindungen. Sie sind die Bitterstoffe der Asteraceae (KORTE et al., 1959), die nach ihrer Isolierung in kristalliner oder viskoser Form anfallen. Eine Übersicht über ihre Chemie, Biogenese, ihr Vorkommen und ihre taxonomische Bedeutung geben SORM u. DOLEJS (1965), STELLINK u. SPITZNER (1966), HEROUT (1966a, 1971), HERZ (1968, 1971), HEROUT u. SORM (1969), GEISSMAN (1973), YOSHIOKA et al. (1973), FISCHER et al. (1976), MABRY u. BOHLMANN (1977) sowie FISCHER et al. (1979).

Biogenetisch leiten sie sich vom trans-trans-Farnesylpyrophosphat ab. Diese aliphatische C_{15}-Verbindung wird zu einem Germacrandienylkation cyclisiert, das nach GEISSMAN als hypothetische Biosynthesevorstufe aller Verbindungen dieser Stoffklasse angesehen werden kann. Anschließende, unterschiedliche Gerüstoxidationen und sekundäre Cyclisierungen dieser Vorstufe führen nach Ausbildung eines γ-Lactonringes zu verschiedenen Grundgerüsten, die der weiteren Unterteilung der Stoffgruppe zugrunde gelegt werden. Abbildung 2 zeigt die wichtigsten Kohlenstoffskelette in der Reihenfolge ihres wahrscheinlichen Biosynthesesweges (FISCHER et al., 1979). Die einzelnen Vertreter der jeweiligen Untergruppen unterscheiden sich vorallem durch die unterschiedlichen Sättigungsgrade der Grundgerüste, durch Zahl und Stellung nachträglich eingeführter Hydroxylgruppen, die darüber hinaus verestert, glykosidiert oder zu Ketogruppen oxidiert

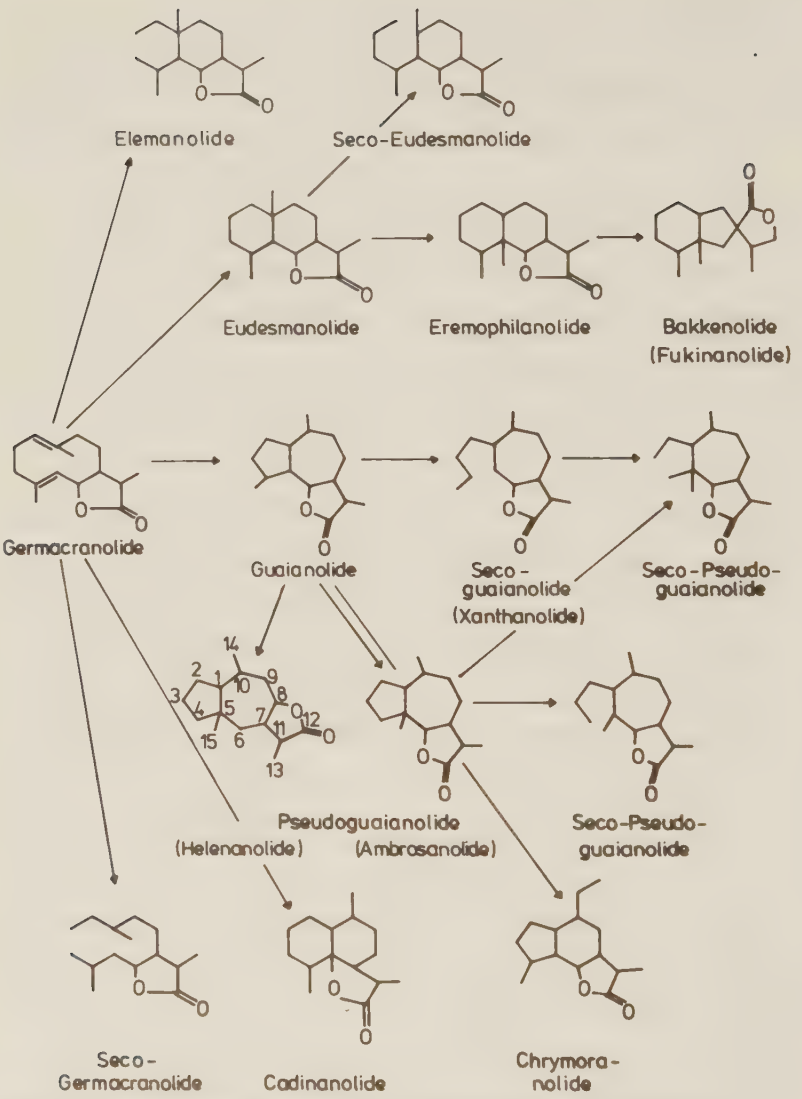


Abb. 2 Sesquiterpenlacton - Grundgerüste und ihr hypothetischer Biosyntheseweg (abgewandelt nach FISCHER, 1979)

werden können, sowie durch unterschiedliche sterische Verhältnisse. Derzeit sind fast 1000 identifizierte Sesquiterpenlactone bekannt (FISCHER et al., 1979).

Das Suffix "olid" im Namen der in der Abbildung wiedergegebenen Strukturtypen bezieht sich auf den γ-Lactonring als gemeinsames Merkmal der Asteraceen - Sesquiterpenlactone. Mit Ausnahme der Eremophilanolide kann dieser Lactonring sowohl zur Position 8 hin, als auch zur Position 6 hin geschlossen sein. HERZ (1973) differenzierte diese Grundgerüste noch weitergehend. So wird von ihm die Gruppe der Pseudoguaianolide, die den oft ungesättigten Lactonring in 6,7 - cis-, 7,8 - cis- oder 7,8 - trans-Stellung gebunden haben können (RÜCKER, 1973), in die Gruppe der Helenanolide (7,8 - geknüpfter Lactonring) und der Ambrosanolide (6,7 - geknüpfter Lactonring) unterteilt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde der Name "Ambrosanolide" als Synonym für die Bezeichnung "Pseudoguaianolide" verwendet (HEROUT, 1966b). Vor kurzem sind auch Pseudoguaianolide mit einem sechsgliederigen 7,9 - geknüpften δ-Lactonring gefunden worden (DOMINGUEZ et al., 1980).

Formal leiten sich die Pseudoguaianolide, wie sie in Arnica montana L. vorkommen, von den Guaianoliden durch die Wanderung einer Methylgruppe von C-4 nach C-5 ab. Die Zählweise der C-Atome in dem Grundgerüst der Pseudoguaianolide erfolgt in der vorliegenden Arbeit nach der Nummerierung von GEISSMAN u. GRIFFIN (1971).

C. Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von Arnica montana L.

I. Gewinnung der Sesquiterpenlacton - Fraktion

1. Herstellung der Extrakte

Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften können Sesquiterpenlactone (Sl) sowohl mit lipophilen als auch mit hydrophilen Lösungsmitteln aus Drogen extrahiert werden. Zur Ermittlung eines für die Arnica - Sl am besten geeigneten Extraktionsverfahrens sowie zur Überprüfung des Extraktionsergebnisses wurden die Arnikablüten mit lipophilen und hydrophilen Lösungsmitteln extrahiert und die erhaltenen Drogenrückstände mit einem Lösungsmittel anderer Polarität nachextrahiert. Die dabei erhaltenen Extrakte wurden jeweils durch DC - Analyse auf das Auftreten von Sl überprüft.

Abbildung 3 gibt das Schema der durchgeführten Extraktionen wieder.

E x t r a k t A: Die getrocknete und gemahlene Droge (3,25 kg) wurde im Soxhlet mit Cyclohexan erschöpfend extrahiert. In Anlehnung an POPLAWSKI et al. (1971) und HERRMANN (1978) wurde der Rückstand des Cyclohexanextraktes mit 60%-igem Ethanol ausgezogen und die nach Abziehen des Alkohols verbleibende, milchigtrübe, wässerige Phase mehrfach mit Chloroform ausgeschüttelt. Der über Calciumchlorid getrocknete Chloroformauszug wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand zur weiteren Reinigung mit einem

Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5:4:2:1) über eine Säule mit neutralem Aluminiumoxid eluiert. Danach lagen 17,10 g (entsprechend 0,53% des Blütentrockengewichtes) einer sirupartigen Fraktion vor (= Extrakt A).

E x t r a k t B: Der nach Cyclohexanextraktion erhaltene Drogenrückstand wurde anschließend mit Aceton erschöpfend weiter extrahiert. Der erhaltene Acetonextrakt wurde wie bei Extrakt A beschrieben weiter gereinigt. Als Rückstand fielen hier 3,00 g (entsprechend 0,09% des Blütentrockengewichtes) einer sirupösen Fraktion an (= Extrakt B).

E x t r a k t C: In einem weiteren Ansatz wurden 1,00 kg getrocknete und gepulverte Blütendroge erschöpfend mit Wasser extrahiert. Danach wurde die wässerige Extraktlösung mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Abzug des über Calciumchlorid getrockneten Chloroforms im Vakuum wurden 1,70 g (entsprechend 0,17% des Blütentrockengewichtes) eines braunen, klebrigen Rückstandes erhalten (= Extrakt C), der ohne weitere Reinigung zur DC - Analyse herangezogen wurde.

E x t r a k t D: Der Drogenrückstand wurde anschließend mit Methanol extrahiert, der Extrakt im Vakuum eingeengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die trübe, gelblichgrüne, wässerige Lösung wurde danach mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Abziehen des über Calciumchlorid getrockneten Chloroforms im Vakuum verblieben 2,05 g (entsprechend 0,2% des Blütentrockengewichtes) eines stark gelbgrün gefärbten Rückstandes (= Extrakt D).

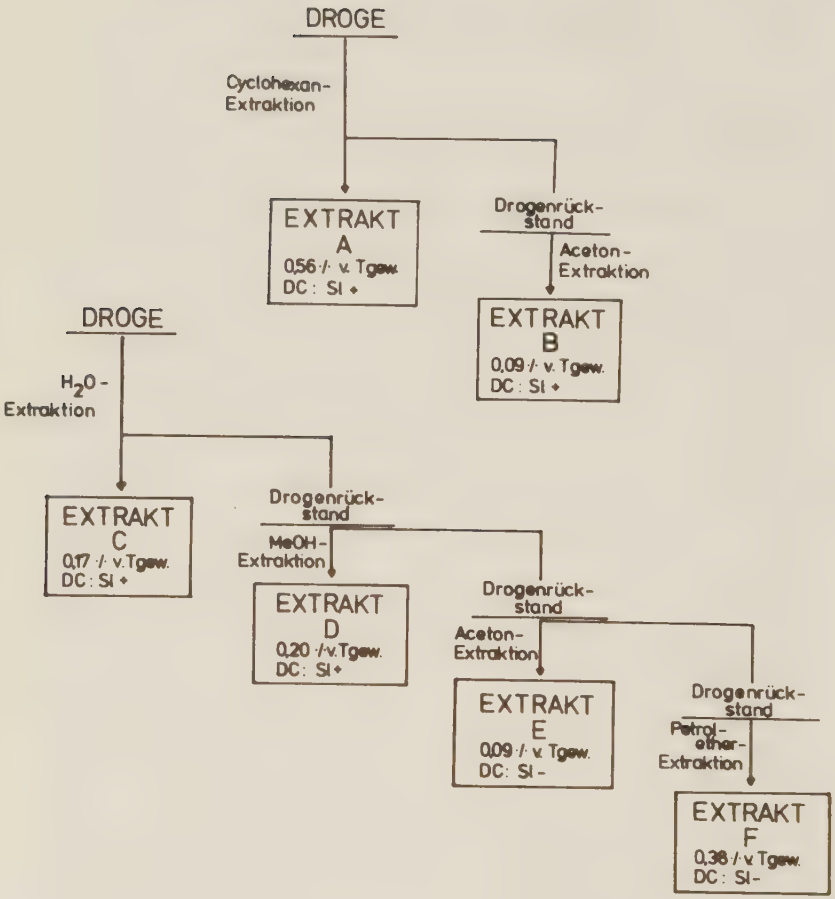


Abb. 3 Schema des Extraktionsganges für die Sl - Gewinnung

E x t r a k t E: Die mit Methanol extrahierte Droge wurde anschließend mit Aceton im Soxhlet weiter extrahiert und der Acetonextrakt wie beim Extrakt D beschrieben aufgearbeitet. Daraus resultierten 0,87 g (entsprechend 0,09% des Blütentrockengewichtes) eines gelblichbraunen Drogenextraktes (= Extrakt E).

E x t r a k t F: Im Anschluß daran wurde der Drogenrückstand mit Petrolether extrahiert und dieser Auszug wie unter Extrakt A beschrieben weiter aufgearbeitet. Es fielen 3,80 g Extrakt (entsprechend 0,38% des Blütentrockengewichtes) von braungelber Farbe an (= Extrakt F).

2. DC - Analyse der hergestellten Extrakte

2.1. Detektion der Sesquiterpenlactone

Für die in ihrer Struktur sehr variablen Sl gibt es kein für alle Verbindungen dieser Stoffgruppe selektives Detektionsmittel. Für ihren dünnschichtchromatographischen (dc) Nachweis in pflanzlichen Extrakten ist es deshalb erforderlich, verschiedene Sprühreagenzien heranzuziehen, die jeweils auf spezifische Strukturen des Moleküls ausgerichtet sind. Verwendet wurden folgende Reagenzien:

a) Hydroxylamin/$FeCl_3$: Dieses zum Nachweis von Carbonsäuren und deren Estern verwendete Reagenz (FEIGL et al., 1934) gibt auch mit Lactonen eine Braunfärbung. Es kann deshalb nach Ausschluß von phenolischen Verbindungen als relativ spezifisches Detektionsmittel für den Nachweis von Lactonen angesehen werden.

b) ZIMMERMANN-Reagenz: Durch benachbarte Carbonylfunktionen aktivierte Protonen reagieren in alkalischer Lösung mit 1,3-Dinitrobenzol. Daher kann dieses Reagenz zur Detektion entsprechender Sl herangezogen werden (NEHER, 1964). Helenalin und seine Derivate sind mit diesem Reagenz unter Violettfärbung sehr empfindlich detektierbar (WILLUHN u. HERRMANN, 1978).

c) 2,4-Dinitrophenylhydrazin: Sl mit Ketogruppen, wie sie bei Helenalin und seinen Derivaten vorliegen, lassen sich durch gelb- bis orangefarbene Dinitrophenylhydrazone auf der Platte nachweisen.

d) EP - Reagenz: Eine Reihe von Sl kann als Proazulene mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in blau gefärbte Azulenfarbstoffe überführt werden. Von den bisher in Arnica - Arten gefundenen Sl lassen sich hiermit die Xanthanolide Carabron und Xanthalongin auf der Platte detektieren (HERRMANN, 1978).

e) Anisaldehyd/H_2SO_4: Hierbei handelt es sich um ein Nachweisreagenz für terpenoide Verbindungen (STAHL, 1962). Die Helenalinderivate reagieren unter Gelbfärbung, während die beiden Xanthanolide eine orange und die Chamissonolide eine braune bzw. lila Färbung ergeben (WILLUHN u. HERRMANN, 1978; WILLUHN et al., 1981).

f) UV - Licht: Im kurzwelligen UV - Licht (254 nm) sind die Sl in der Regel durch eine Fluoreszenzlöschung zu erkennen.

2.2. DC - Auftrennung der Extrakte

Die hergestellten Extrakte wurden in mehreren Fließmittelsystemen (s. Exp. Teil, S. 140) an Kieselgel - Platten aufgetrennt. Als Vergleichssubstanzen wurden Helenalin, Helenalinacetat und -methacrylat sowie 11,13-Dihydrohelenalin und dessen Essigsäure-, Isovaleriansäure-, Isobutter- und Methacrylsäureester (Arnicolide A, B, C, D) aufgetragen.* Darüber hinaus wurde ein aus den Blättern von Arnica montana L. hergestellter Sl - Extrakt (entsprechend Extrakt A) mitchromatographiert. Abbildung 4 zeigt als Beispiel die DC - Trennung in dem von WILLUHN u. HERRMANN (1978) benutzten Fließmittel n-Pentan/Ether (32:68) nach erfolgter Detektion mit ZIMMERMANN - Reagenz. Sowohl im Extrakt A und C traten neben den bereits bekannten Sl Helenalinacetat, 11,13-Dihydrohelenalinacetat und Helenalinmethacrylat fünf weitere ZIMMERMANN-positive Verbindungen auf. Mit Hydroxylamin/$FeCl_3$ reagierten sie unter Braunfärbung, mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und Anisaldehyd/H_2SO_4 wie die Vergleichssubstanzen unter schwacher Gelbfärbung. Bei Detektion mit dem letztgenannten Reagenz erschienen im Chromatogramm darüber hinaus zahlreiche weitere Verbindungen, so daß dieses Reagenz besonders gut zum Nachweis

---

*Herrn Dr. M. Holub, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag, danke ich herzlich für die überlassenen Arnicolide.

des gesamten Komponentenspektrums in der mit S1 angereicherten Fraktion geeignet ist. Die beiden Xanthanolide und Chamissonolide konnten in den Extrakten nicht nachgewiesen werden. Die Auftrennung in den anderen Fließmittelsystemen führte zu keinen zusätzlichen Komponenten, die aufgrund der benutzten Detektionsreagenzien als S1 hätten angesprochen werden können.

Wie aus der Abbildung 4 hervorgeht, haben Helenalin und seine Ester in diesem System jeweils eine größere Laufhöhe als 11,13-Dihydrohelenalin und seine Ester. Bei beiden Gruppen läßt sich darüber hinaus auch eine unterschiedliche Färbung nach Detektion mit ZIMMERMANN - Reagenz feststellen. Helenalin und seine Ester ergeben hier intensiv blauviolett gefärbte Reaktionsprodukte, 11,13-Dihydrohelenalin und seine Ester dagegen solche von rötlichlila Farbe. Beide Farben sind allerdings nicht beständig und verblassen im Verlaufe einiger Stunden.

Im Blattextrakt traten nur vier S1 - Komponenten auf, bei denen es sich um das bereits hieraus isolierte 11,13-Dihydrohelenalin und seine Ester, die Arnicolide A, B, C, D, handelte. Die Arnicolide C und D trennten sich in diesem System nicht. Die durchgeführten DC - Analysen ließen vermuten, daß das im Vergleich zu den Blättern umfangreichere S1 - Komponentenspektrum der Arnikablüten daraus resultiert, daß hier außer den 11,13-Dihydrohelenalinderivaten zusätzlich die analogen Helenalinderivate auftreten. Dies wäre für die pharmakologische Wirkung, die mit den Extrakten

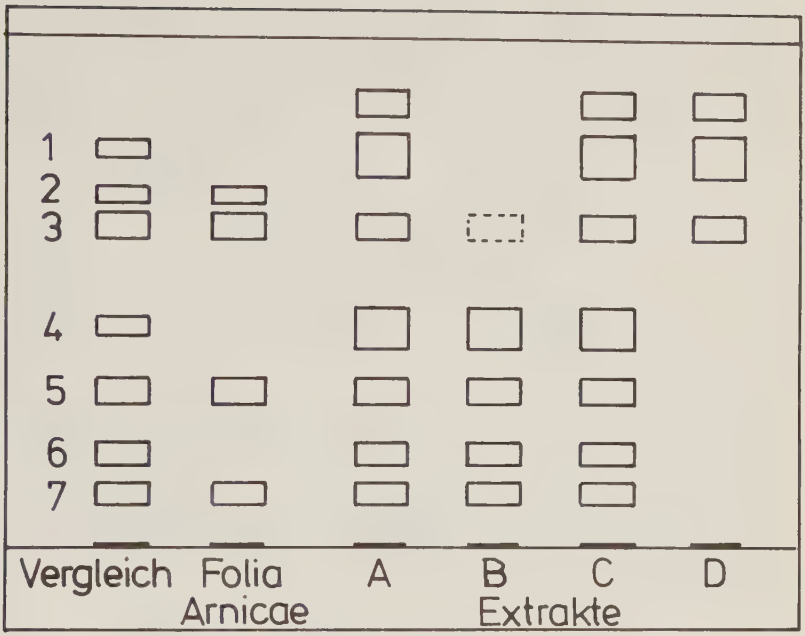


Abb. 4 Schema - Chromatogramm der hergestellten Sl - Extrakte

(vgl. Abb. 3; Extrakte E und F Sl-frei)

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
Laufmittel: n-Pentan/Ether (32:68)
Detektion: ZIMMERMANN - Reagenz
Vergleichssubstanzen: 1 = Helenalinmethacrylat
2 = Dihydrohelenalinisovalerianat
3 = Dihydrohelenalinester
4 = Helenalinacetat
5 = Dihydrohelenalinacetat
6 = Helenalin
7 = Dihydrohelenalin

aus diesen Pflanzenorganen erzielbar sind, von großer Bedeutung.

Die durchgeführten Extraktionen zeigen, daß sowohl mit Cyclohexan als auch mit Wasser zwar sämtliche Sl der Droge entzogen werden können, daß eine quantitative Extraktion hierbei jedoch nicht erreicht wurde. Bei der Nachextraktion mit einem hydrophilen bzw. lipophilen Lösungsmittel werden im ersteren Falle (Extrakt B) noch weitere, dc mit Helenalin, 11,13-Dihydrohelenalin und ihren Acetaten identische Sl erhalten, im zweiten Falle (Extrakt D) dagegen noch die lipophileren, wohl veresterten Sl (s. Abb. 4). Neue Sl treten in diesen Extrakten allerdings nicht auf. Eine weitergehende Extraktion der Droge führt zu Auszügen, die frei von Sl sind (Extrakte E und F). Zur Isolierung der einzelnen dc nachgewiesenen Sl wurde vom Extrakt A ausgegangen.

II. Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone

1. Fraktionierung des Sl - Extraktes A

Zur Isolierung der Sesquiterpenlactone wurde der Extrakt A mit einem n-Pentan/Ether - Gemisch (32:68) säulenchromatographisch (sc) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden nach dc Überprüfung zu zwölf Teilfraktionen vereinigt (s. Exp. Teil, S. 148). Abbildung 5 zeigt das Ergebnis dieser Trennung, die bereits zu Fraktionen führte, in denen jeweils nur ein Sl dc nachweisbar war. Die Detektion mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 zeigte aber, daß in diesen Teilfraktionen daneben

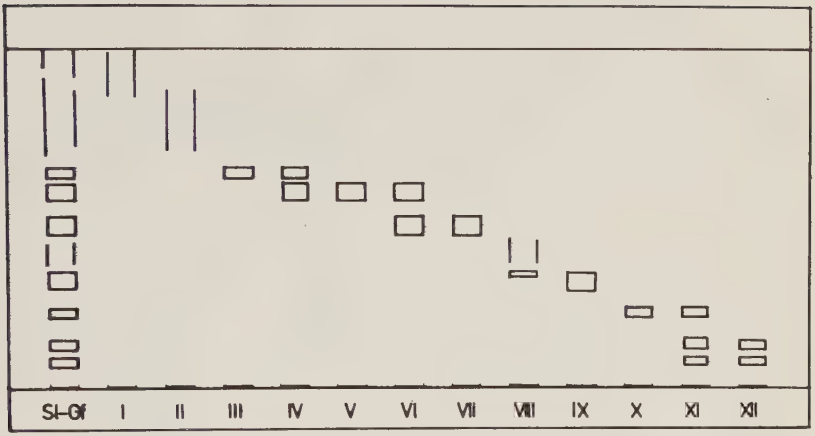


Abb. 5 Ergebnis der sc Auftrennung des Extraktes A

Sl-Gf: Sesquiterpenlactongesamtfraktion
I - XII vereinigte Einzelfraktionen
Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
Lösungsmittel: n-Pentan/Ether (32:68)
Detektion: ▭ ZIMMERMANN - Reaktion positiv

noch weitere Komponenten vorlagen. Deshalb wurden diese Teilfraktionen durch wiederholte SC soweit gereinigt, bis auch nach Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4 weitgehend einheitliche Sl - Fraktionen auftraten.

2. Isolierung und Identifizierung von Helenalin-2-methylbuttersäureester und Helenalinisovaleriansäureester

2.1. GC/MS - Analyse und Reindarstellung durch präparative HPLC

Die nach Fraktionierung des Extraktes A erhaltene, gelbliche, viskose Teilfraktion III (0,67 g), in der neben anderen Komponenten lediglich das S1 mit der größten Laufhöhe vorlag (s. Abb. 5), wurde zur weiteren Reinigung an Kieselgel mit n-Pentan unter steigendem Zusatz von Ether sc aufgetrennt. Dabei wurden 82,0 mg einer viskosen Fraktion erhalten, die dc in mehreren Systemen praktisch einheitlich war und bei der Detektion die Farbreaktion für S1 ergab. Die gaschromatographische (gc) Überprüfung an einer 6 m langen OV-101-Kapillarsäule ergab jedoch, daß hier zwei Hauptkomponenten vorlagen (s. Abb. 6). Durch gekoppelte GC/MS - Analyse konnte von beiden Verbindungen ein Massenspektrum aufgenommen werden. Beide zeigten einen Molekülpeak bei M^+= 346 und ein übereinstimmendes Frag-

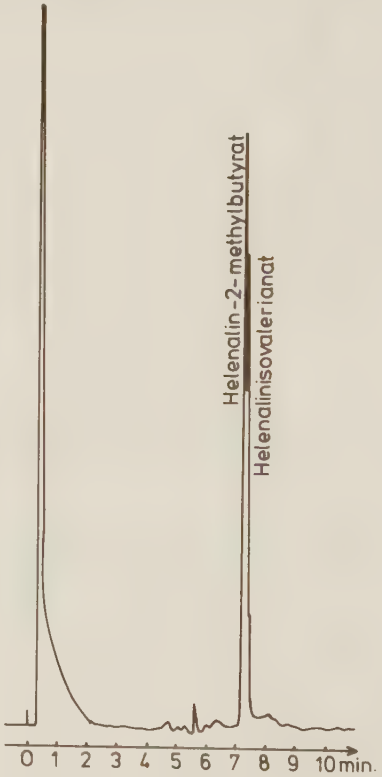


Abb. 6 GC der gereinigten Fraktion III (System I)

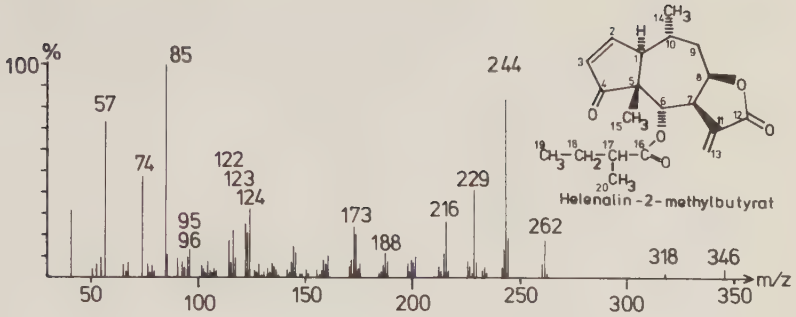


Abb. 7 Massenspektrum von Helenalin-2-methylbuttersäureester

mentierungsmuster (s. Abb. 7). Die auftretenden Spaltprodukte bei m/z = 95, 96, 122, 123 und 124 deuteten auf Pseudoguaianolide mit einer Sauerstoffunktion an C-4, C-6 und C-8 hin (TSAI et al., 1969; s.a. Kap. III, S. 71). Die weiteren Fragmente sprachen für das Vorliegen von Helenalinestern (HERRMANN, 1978). Das in beiden Spektren auftretende Fragment m/z = 244 resultierte aus der Abspaltung der Säure (M^+-102) bzw. aus der Abspaltung der Acylgruppe und Wasser [M^+-(84+18)] (IMAKURA et al., 1980). Daraus folgte, daß es sich bei der Säurekomponente der beiden Verbindungen um isomere, gesättigte C_5-Säuren handeln mußte, die als Acylfragment mit der Masse m/z = 85 jeweils den Basispeak bildeten.

Zur Bestätigung des MS - Analysenergebnisses wurden 3 mg Helenalin nach einer Vorschrift von LEE et al. (1973) mit Isovaleriansäurechlorid umgesetzt und das entstandene Helenalinisovalerianat durch GC und GC/MS - Analyse mit der

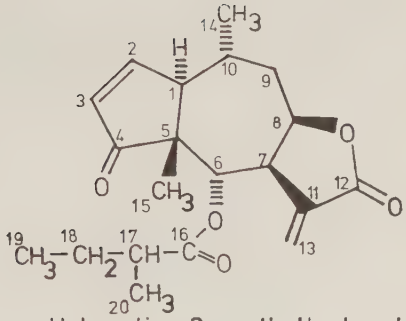
isolierten Fraktion verglichen. Der synthetisierte Ester war gc identisch mit der im GC als zweite Komponente erscheinenden Substanz und stimmte auch in seinen Massenspektren vollständig mit dieser überein.

Versuche einer Trennung der beiden isomeren Helenalinester durch SC oder präparative DC blieben erfolglos. Daher wurde hierfür die präparative HPLC eingesetzt. Wegen der schlechten Löslichkeit der Fraktion in hydrophilen Lösungsmitteln (Methanol und Methanol/Wasser - Gemischen) war eine Trennung an einer Reverse - Phase - Säule nicht möglich. An einer Kieselgelsäule gelang es schließlich, die Fraktion soweit zu trennen (Elutionsmittel: n-Hexan/Isopropanol, 92,5 g:7,5 g), daß 12,7 mg der im GC zuerst erscheinenden Komponente kapillargaschromatographisch einheitlich gewonnen werden konnten.

2.2. Identifizierung von Helenalin-2-methylbuttersäureester

Die isolierte Verbindung war farblos und stark viskos; sie konnte trotz wiederholter Versuche nicht zur Kristallisation gebracht werden. Das UV - Spektrum zeigte ein Maximum bei 218 nm (ϵ = 12650) und wies damit auf ein Sl mit einer Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe des Lactonringes hin (DEUEL u. GEISSMAN, 1957).

Das IR - Spektrum (Abb. 8) zeigte Signale für diese Exomethylengruppe bei 3100, 1658, 1270 und 822 cm^{-1}. Die Ketogruppe des γ-Lactonringes erschien bei 1768 cm^{-1}. Die



Banden bei 1732 und 1711 cm^{-1} können der Ketogruppe des Esters bzw. der Carbonylfunktion des Cyclopentenonringes zugeordnet werden und die Bande bei 1570 cm^{-1} der Doppelbindung des Cyclopentenonringes. Diese Angaben stimmen mit den für Helenalinester in der Literatur angegebenen Signalen überein (LEE et al., 1972; LIST u. FRIEBEL, 1974; HERRMANN et al., 1978).

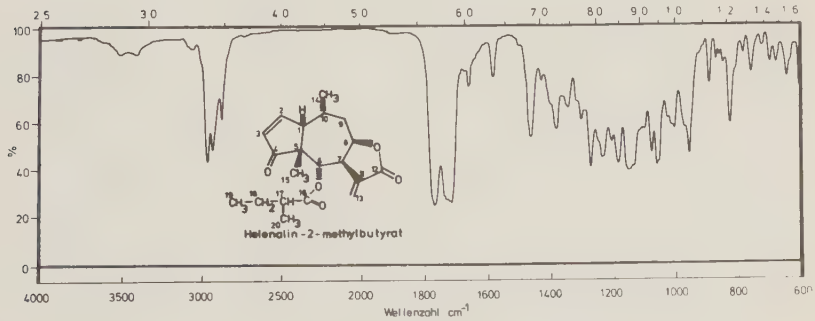


Abb. 8 IR - Spektrum von Helenalin-2-methylbuttersäureester

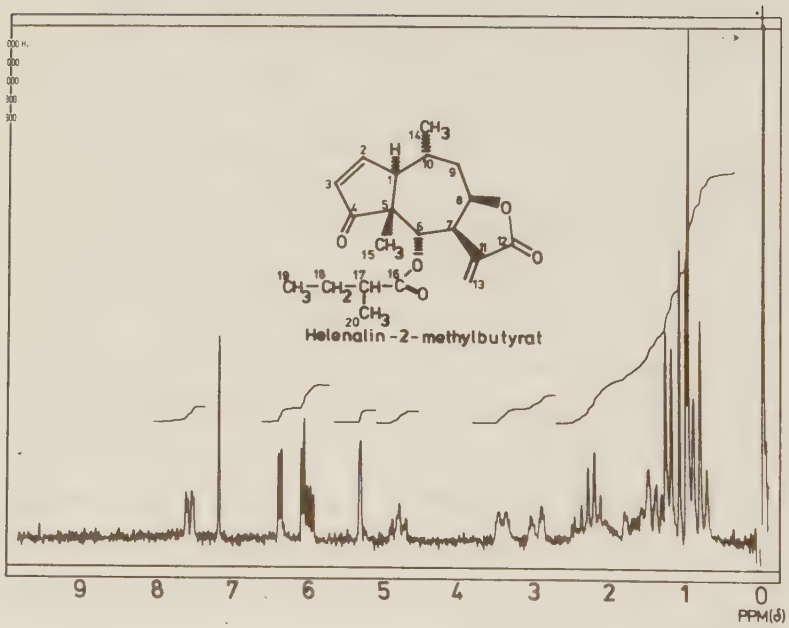


Abb. 9 ^{1}H-NMR-Spektrum von Helenalin-2-methylbuttersäureester

Das ^{1}H-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung (Abb. 9) stimmte in seinen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten mit den Werten überein, die für Helenalinester bekannt sind (HERRMANN, 1978; BOHLMANN et al., 1981). In Tabelle 1 sind die ^{1}H-NMR-Werte des neuen Helenalinesters aufgeführt und hinsichtlich des Helenalinanteils den Angaben gegenübergestellt, die von BOHLMANN et al. (1981) für den aus Kingianthus paradoxus isolierten Helenalinhydroxymethacrylsäureester (Kingiolid) gemacht werden. Die Exomethylengruppe des γ-Lactonringes wird durch die Dubletts

Tab. 1: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von Helenalin-2-methylbuttersäureester [80 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

	isolierte Verbindung			Literaturwerte für Helenalin[1] u. 2-Methylbuttersäure[2]		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H - 1	3,01 ddd	1/2	1,9	3,04 ddd	1/2	1,8
H - 2	7,61 dd	1/3	2,7	7,69 dd	1/3	2,7
H - 3	6,04 dd	1/10	11,6	6,08 dd	1/10	11,5
H - 6	5,36 br s	2/3	6,0	5,46 br s	2/3	6,0
H - 7	3,47 m	6/7	< 1	3,59 m	6/7	< 1
H - 8	4,83 ddd	7/13	2,9	4,90 ddd	7/13	3,0
H - 9	2,41 ddd	7/13'	2,7	2,41 ddd	7/13'	2,7
H - 9'	1,71 ddd	7/8	7,5	1,75 ddd	7/8	7,5
H - 10	bei 2,1	8/9	7,5	2,19 m	8/9	7,5
H - 13	6,41 d	8/9'	2,4	6,42 d	8/9'	2,5
H - 13'	6,10 d	9/9'	15,0	6,16 d	9/9'	15,0
C_{10} - Me	1,25 d	9/10	-	1,29 d	9/10	3,5
C_5 - Me	1,00 s	9'/10	8,0	1,04 s	9'/10	8,0
H - 17	bei 2,3	10/14	7,0	2,4 m	10/14	7,0
H - 18	bei 1,5	17/20	6,9	bei 1,5	17/20	7,0
C_{17} - Me	1,06 d	18/19	7,1	1,10 d	18/19	7,0
C_{18} - Me	0,84 t			0,89 t		

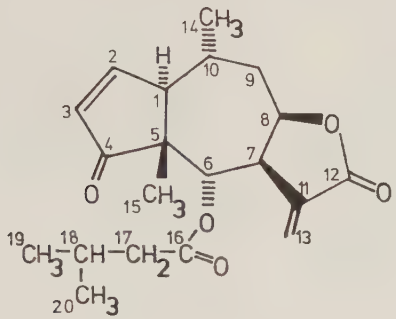
1) BOHLMANN et al. (1981); 2) HERZ et al. (1979)

bei 6,41ppm und 6,10ppm mit den Kopplungskonstanten $J_{7/13}$= 3,0 Hz und $J_{7/13'}$= 2,8 Hz angezeigt. Bei einem 11,13-Dihydrohelenalinester fehlen diese Dubletts; stattdessen tritt bei ca. 1,5ppm ein Dublett für die Methylgruppe an C-11 auf (POPLAWSKI et al., 1971). Im Einklang mit diesen Werten steht die Tieffeldverschiebung des Protons H-7 (3,47ppm), die für Helenalinderivate im Vergleich zu den 11,13-Dihydroverbindungen ebenfalls charakteristisch ist (POPLAWSKI et al., 1971).

Aufspaltungsmuster, chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten des Säureanteils der isolierten Verbindung entsprechen den Angaben wie sie von BOHLMANN et al. (1979) und HERZ et al. (1979) für die 2-Methylbuttersäure in Elemanolid- und Guaianolidestern gemacht werden. In Tabelle 1 sind die für die Säurekomponente vergleichbaren Werte der Arbeit von HERZ et al. (1979) entnommen. Das Dublett bei 1,06ppm ist der α-Methylgruppe und das Triplett bei 0,84ppm der endständigen Methylgruppe der 2-Methylbuttersäure zuzuordnen. Nach der vorliegenden Literatur erscheinen die Protonen an C-17 und C-18 im Bereich von 2,4ppm bzw. 1,4ppm - 1,6ppm. Sie werden hier jedoch teilweise von den Protonen H-9, H-9' und H-10 des Helenalingrundkörpers überlagert.

Aufgrund der durchgeführten UV-, IR-, MS- und ^{1}H-NMR - Analysen handelt es sich bei dieser Komponente der Teilfraktion III um Helenalin-2-methylbuttersäureester, dessen natürliches Vorkommen bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist.

2.3. Identifizierung von Helenalinisovaleriansäureester



Helenalinisovalerianat

Zur Isolierung der gc und massenspektrometrisch (ms) mit dem synthetisierten Helenalinisovaleriansäureester identischen Verbindung aus Teilfraktion III wurde der Rückstand der ersten präparativen HPLC - Trennung nach nochmaliger Reinigung über eine Kieselgelsäule erneut der präparativen HPLC zugeführt. Es gelang jedoch nicht, diese Substanz gc einheitlich abzutrennen. Die Fraktion enthielt daneben in etwa gleicher Menge das identifizierte Helenalin-2-methylbutyrat. Von diesem Zweikomponentengemisch, das im UV-Spektrum ein einheitliches Maximum bei 218nm zeigte, wurde ein ^{1}H-NMR-Spektrum aufgenommen (Abb. 10).

Das Spektrum war bis auf ein zusätzlich auftretendes Dublett bei 0,90ppm identisch mit dem von Helenalin-2-methylbuttersäureester (s. Abb. 9). Die chemische Verschiebung dieses Dubletts und die Kopplungskonstante (J = 6,5) sind charakteristisch für die beiden chemisch

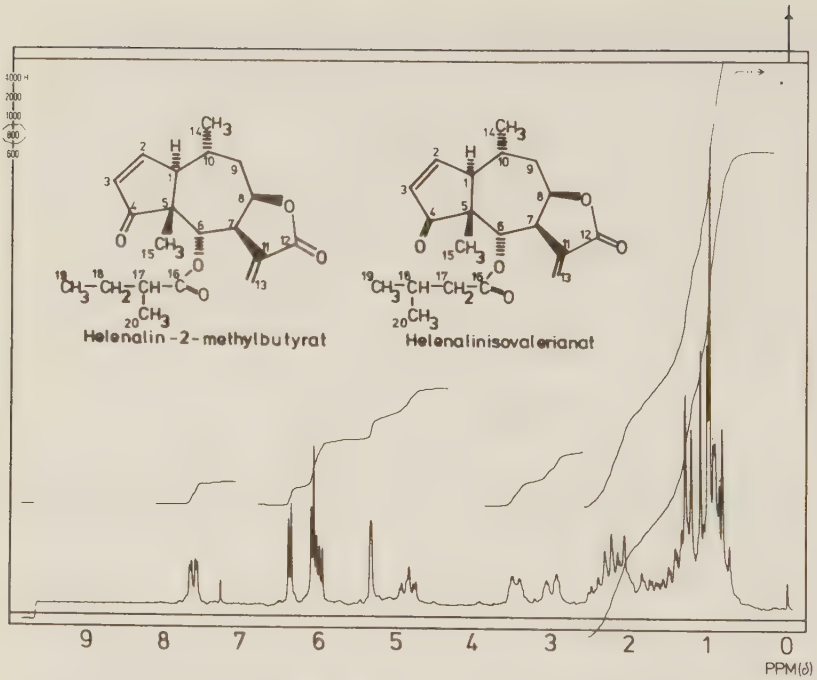


Abb. 10 ^{1}H-NMR-Spektrum des über HPLC abgetrennten Helenalin-2-methylbutyrat / Helenalinisovalerianat - Gemisches

und magnetisch äquivalenten Methylgruppen der Isovaleriansäure, wie sie u.a. für das 11,13-Dihydrohelenalinisovalerianat (Arnicolid B) von POPLAWSKI et al. (1971) angegeben werden.

Danach handelt es sich bei der in der Fraktion III auftretenden zweiten Komponente um Helenalinisolvalerianat, dessen natürliches Vorkommen bisher noch nicht beschrieben worden ist.

3. Isolierung und Identifizierung von Helenalinisobuttersäure-, -α-methacrylsäure- und -tiglinsäureester

3.1. GC/MS - Analyse

Die kapillargaschromatographische Auftrennung der Teilfraktion V (3,76 g), in der das mit Helenalinmethacrylsäureester auf einer Höhe liegende Sil dc einheitlich vorlag (s. Abb. 4 und 5, S. 17 bzw. 19), ergab, daß hier drei Verbindungen als Hauptkomponenten enthalten waren (Abb. 11). Die durch gekoppelte GC/MS - Analyse aufgenommenen Massenspektren zeigten, daß es sich bei allen drei Verbindungen um Helenalinderivate handelte, die in der Reihenfolge ihres Erscheinens im GC einen Molekülpeak bei M^+= 332, M^+= 330 und M^+= 344 aufwiesen. Die einzelnen für Helenalin charakteristischen Fragmente der Massenspektren sind den Abbildungen 12, 13 und 14 zu entnehmen (vgl. auch Tab. 11, S. 74 sowie Kap. III, S. 71). Alle drei Verbindungen bildeten das Fragment m/z = 244, das durch Abspaltung der Säure bzw. der Acylgruppe und Wasser entsteht (IMA-

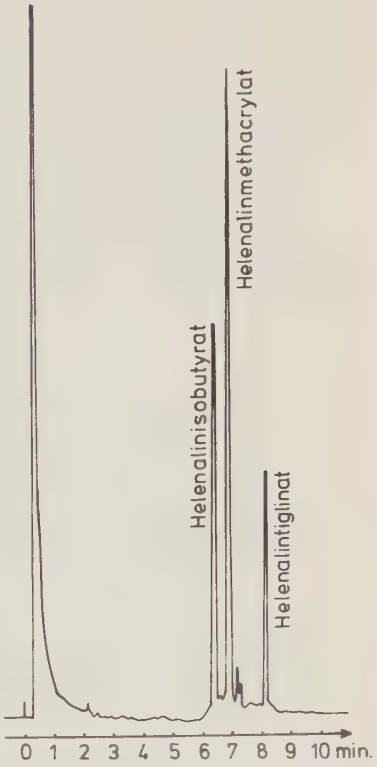


Abb. 11 GC der gereinigten Fraktion V (System I)

KURA et al., 1980). Der entsprechende Basispeak wird jeweils von dem abgespaltenen Acylrest gebildet. Bei der Verbindung mit dem Molekülpeak M^+ = 332 hatte dieser die Masse m/z = 71, die in Verbindung mit dem auftretenden Fragment m/z = 44 (Acylrest - CO) die Säure als gesättigte C_4-Säure auswies.

Bei dem Helenalinderivat mit dem Molekülpeak M^+ = 330 trat ein Acylrest mit der Masse m/z = 69 auf, der auf eine einfach ungesättigte C_4-Säure hinwies. Die Intensitätsunterschiede bei den Spaltprodukten m/z = 122 und 261 im Vergleich zu den Fragmenten m/z = 123, 124 bzw. 262 deuteten darauf hin, daß diese ungesättigte Säure kein α-ständiges Proton trägt (s. Kap. III, S. 71), so daß es sich um die α-Methacrylsäure handeln sollte. Die dritte Verbindung mit dem Molekülpeak M^+ = 344 zeigte den Basispeak bei der Masse m/z = 83, der in Verbindung mit der Masse m/z = 55 (Acylrest - CO) für das Vorliegen einer ungesättigten C_5-Säure sprach (Tiglinsäure, Angelicasäure oder Seneciosäure). Die Intensitätsunterschiede bei den erwähnten Spaltprodukten ließen auch hier den Schluß zu, daß es sich um eine Säure ohne α-ständiges Proton handelt. Es sollte hier also die Tiglin- oder die Angelicasäure vorliegen.

Zur Bestätigung des MS - Analysenergebnisses wurden jeweils 3 mg Helenalin mit Isobuttersäurechlorid und Tiglinsäurechlorid nach der Vorschrift von LEE et al. (1973) umgesetzt. Die erhaltenen Helenalinderivate wurden für einen DC-, GC- und GC/MS-Vergleich herangezogen. Der α-Methacryl-

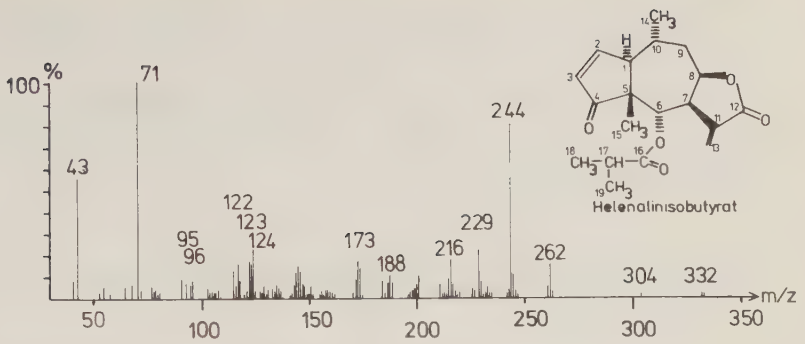


Abb. 12 [illegible]

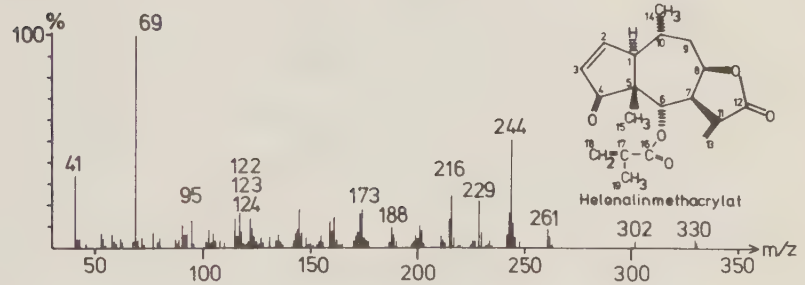


Abb. 13 [illegible]

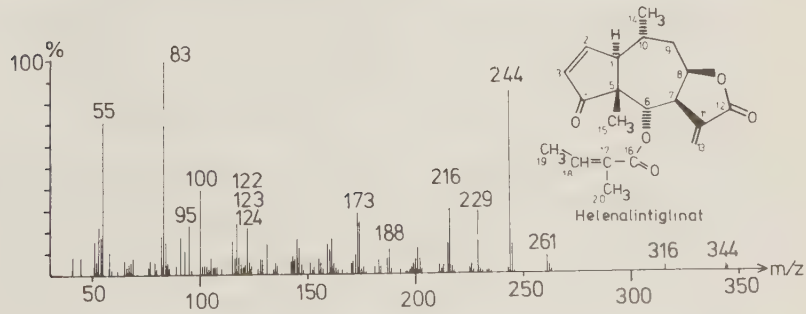
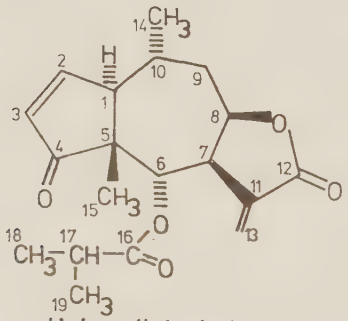


Abb. 14 Massenspektrum von Helenalintiglinat

säureester des Helenalins stand als Vergleichssubstanz zur Verfügung. Die drei Sl der Teilfraktion V erwiesen sich nach Rf-Wert, Retentionszeit und nach ihrem Massenspektrum als identisch mit Helenalinisobutyrat, Helenalinmethacrylat und Helenalintiglinat.

3.2. Isolierung und Identifizierung von Helenalinisobuttersäureester



Helenalinisobutyrat

Zur Reindarstellung der drei Helenalinester wurde die Fraktion sc an Kieselgel mit n-Pentan und n-Pentan/Ether - Gemischen mit allmählich steigendem Etheranteil aufgetrennt. Die gc Überprüfung der angefallenen Fraktionen zeigte, daß es gelungen war, den Helenalinisobuttersäureester weitgehend abzutrennen, während die beiden anderen Ester weiterhin in einer gemeinsamen Fraktion anfielen.

Tabelle 2: Physikalische Konstanten von Helenalinisobuttersäureester

Molekülpeak, M^+	332
Summenformel	$C_{19}H_{24}O_5$
CH - Analyse	Gef.: C, 68,60; H, 7,22; O, 24,18 Ber.: C, 68,67; H, 7,22; O, 24,11
UV - Spektrum λ max	219 nm; ϵ = 12939
Schmelzpunkt	99,5° - 101°C
$[\alpha]_D^{20}$	-127,5° (c=1,9; $CHCl_3$)

Aus der den Helenalinisobuttersäureester als Hauptkomponente enthaltenden Fraktion wurden durch präparative HPLC 29 mg dieses Esters dc und gc einheitlich gewonnen. Die aus Ether/Petrolether kristallisierende Verbindung schmolz bei 99,5° - 101°C und hatte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20}$ = -127,5° (Chloroform). Das UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei 219 nm (ϵ = 12939).

Das IR - Spektrum zeigte die Signale für die Exomethylengruppe (3105, 1660, 1273, 820 cm^{-1}), die Doppelbindung des Cyclopentenonringes (1580 cm^{-1}) und die dazu gehörige Carbonylfunktion (1710 cm^{-1}) sowie die Signale für die Carbonylfunktion des Lactonringes (1761 cm^{-1}) und für die Esterfunktion (1730 cm^{-1}).

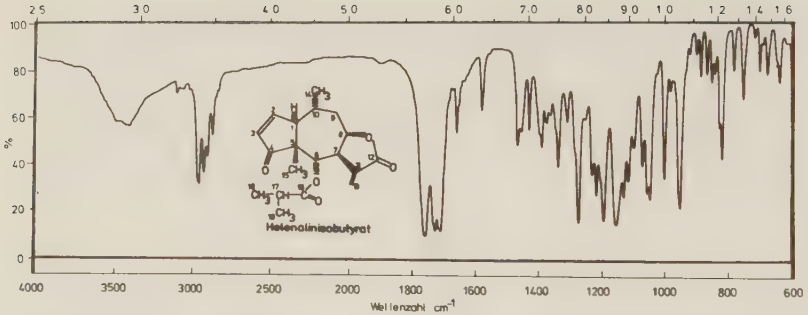


Abb. 15 IR - Spektrum von Helenalinisobuttersäureester

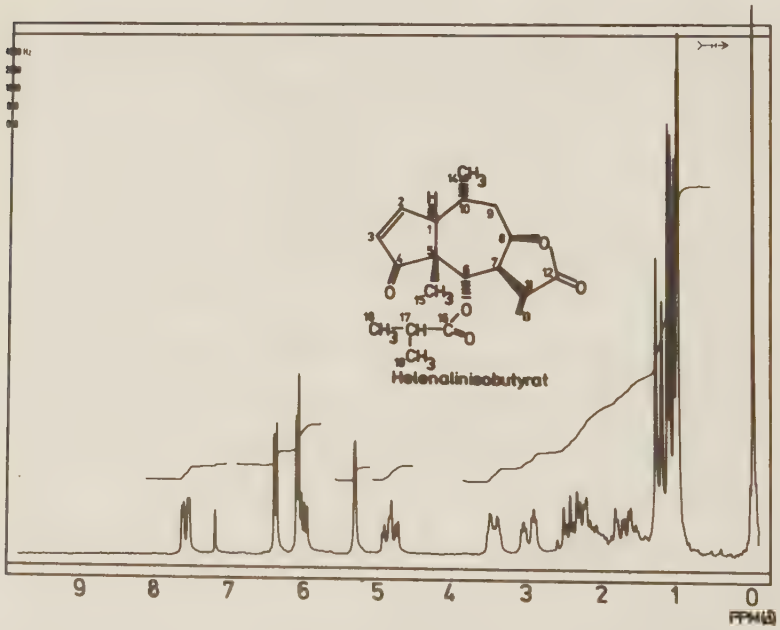


Abb. 16 ^{1}H-NMR-Spektrum des Helenalinisobuttersäureesters

Tab. 3: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von Helenalinisobuttersäureester [80 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

	isolierte Verbindung			Literaturwerte für 11,13-Dihydrohelenalinisobutyrat		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H - 1	2,99 ddd	1/2	2,0	-	1/2	1,8
H - 2	7,60 dd	1/3	2,9	7,67 dd	1/3	3,0
H - 3	6,00 dd	1/10	11,7	6,06 dd	1/10	-
H - 6	5,32 br s	2/3	6,1	5,41 s	2/3	6,0
H - 7	3,45 m	6/7	< 1	2,81 m	6/7	-
H - 8	4,83 ddd	7/13	2,6	4,75 ddd	7/13	-
H - 9	bei 2,4	7/13'	2,9	-	7/11	10,0
H - 9'	1,71 ddd	7/8	7,4	1,63 ddd	7/8	6,5
H - 10	bei 2,1	8/9	7,4	-	8/9	6,0
H - 13	6,38 d	8/9'	2,5	-	8/9'	1,7
H - 13'	6,08 d	9/9'	14,9	1,51[a)]	9/9'	15,0
C_{10} - Me	1,24 d	9/10	-	1,24 d	9/10	-
C_5 - Me	1,00 s	9'/10	7,9	1,03 d	9'/10	11,0
H - 17	bei 2,4	10/14	6,9	-	10/14	6,4
C_{17} - Me	1,05 d	17/18	7,1	1,04 d	17/18	7,1
C_{17} - Me'	1,08 d	17/19	7,1	1,08 d	17/19	7,1

1) POPLAWSKI et al. (1971)

a) C_{11} - Me

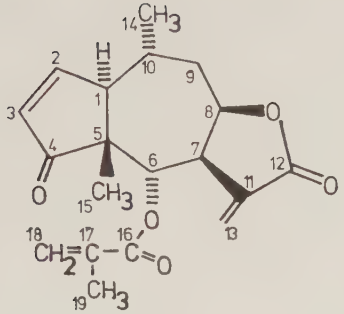
Im ^{1}H-NMR-Spektrum erschienen alle Signale für die Helenalinstruktur (Abb. 16; Tab. 3). Die beiden Methylgruppen der Isobuttersäure geben sich als Dubletts bei 1,05ppm und 1,08ppm mit einer Kopplungskonstante von jeweils J = 7,1 Hz zu erkennen. Ihre chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten entsprechen den Werten, wie sie von POPLAWSKI et al. (1971) für den Isobuttersäureester des 11,13-Dihydrohelenalins (Arnicolid C) angegeben werden. Das ^{1}H-NMR-Spektrum unterschied sich von dieser Verbindung wiederum nur, wie beim Helenalin-/11,13-Dihydrohelenalin-2-methylbuttersäureester diskutiert, durch die Signale der beiden Protonen an C-13 und die Tieffeldverschiebung von H_7.

Damit ist die Struktur der isolierten Verbindung als Helenalinisobuttersäureester eindeutig bewiesen. Dieser Helenalinester ist bisher noch nicht in Pflanzen gefunden worden.

3.3. Identifizierung von Helenalin-α-methacrylsäureester

Die nach der erneuten sc Auftrennung gemeinsam in einer Fraktion auftretenden beiden anderen Helenalinester konnten durch wiederholte präparative HPLC an einer Kieselgelsäule von einander getrennt werden. Von der nach GC - und GC/MS - Analyse mit Helenalinmethacrylat identischen Verbindung lagen danach 6 mg gc einheitlich vor.

Die Verbindung schmolz bei 117° - 119°C und zeigte ein UV - Maximum bei 212 nm, was auf das Vorliegen einer Exomethylengruppe am γ-Lactonring hindeutete (DEUEL u. GEISSMAN, 1957).



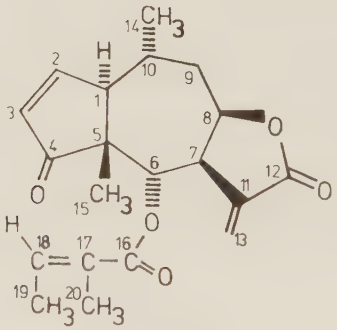
Helenalinmethacrylat

Im IR - Spektrum traten die Signale für die Exomethylengruppe bei 3100, 1660, 1270 und 818 cm^{-1} auf. Eine Bande bei 1582 cm^{-1} war der Doppelbindung des Cyclopentenonringes zuzuordnen, eine Bande bei 1713 cm^{-1} der zugehörigen Carbonylfunktion. Dieses Signal wurde jedoch von der Bande für die Ketogruppe der Esterfunktion (1718 cm^{-1}) überlagert. Bei 1762 cm^{-1} trat die Bande für die Carbonylfunktion des Lactonringes auf. Diese Werte entsprechen denen, die HERRMANN et al. (1979) für diesen Helenalinester angeben. Darüber hinaus trat bei 1638 cm^{-1} das Signal für die α-β-ungesättigte Struktur der α-Methacrylsäure auf (BOHLMANN et al., 1977).

Ein Vergleich der ^{1}H-NMR-Daten (Exp. Teil, S. 151) der isolierten Verbindung mit den Angaben von HERRMANN et al. (1978) für Helenalinmethacrylat zeigte eine vollständige Übereinstimmung beider Verbindungen. Man findet bei 6,46ppm und 6,17ppm je ein Dublett, die den beiden Protonen der Exomethylengruppe zugeordnet werden können, und die für

Helenalinester typische Tieffeldverschiebung von H-7. Mit Ausnahme dieser beiden strukturbedingten Unterschiede war das ^{1}H-NMR-Spektrum auch identisch mit dem von Dihydrohelenalinmethacrylat (= Arnicolid D, POPLAWSKI et al., 1971). Damit ist die Identität dieses Helenalinesters mit dem von HERRMANN et al.(1978) aus den Blütenkörbchen von A. montana isolierten Helenalin-α-methacrylsäureester bewiesen.

3.4. Identifizierung von Helenalintiglinsäureester



Helenalintiglinat

Neben Helenalinmethacrylat fielen bei der präparativen HPLC - Auftrennung 10 mg von Helenalintiglinat gc nahezu einheitlich an. Die hochviskose Substanz kristallisierte während der Trocknung über Phosphorpentoxid, nachdem es zunächst nicht gelungen war, sie aus verschiedenen Lösungsmitteln zur Kristallisation zu bringen. Die Kristalle schmolzen bei 82° - 84,5°C und zeigten ein UV - Maximum bei 216 nm (ϵ = 13458). Im IR - Spektrum erschienen die Signale für die Exomethylengruppe des γ-Lactonringes bei 3100, 1655, 1267 und 820 cm^{-1}. Die Doppelbindung des Cyclo-

pentenonringes war bei 1582 cm^{-1} zu finden, die dazugehörige Carbonylfunktion bei 1720 cm^{-1}. Diese Bande wurde von dem Signal der Carbonylfunktion des Esters überlagert wie dies auch von anderen Sl - Estern bekannt ist (POPLAWSKI et al., 1971). Die Carbonylgruppe des Lactonringes erschien bei 1760 cm^{-1}. Ein Signal bei 1646 cm^{-1} kann der Doppelbindung der α-β-ungesättigten Säure zugeordnet werden (BOHLMANN et al., 1977 und 1979), das sich hier teilweise mit der Bande für die Exomethylengruppe überlagert (s. Abb. 17).

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 18; Tab. 4, S. 41) zeigte die für Helenalinester bekannten Signale (BOHLMANN et al., 1981; vgl. auch Tab. 1, S. 25). Aufspaltungsmuster, chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Säurekomponente im isolierten Helenalintiglinsäureester entsprachen den Werten, die BOHLMANN et al. (1977) für den Säureanteil des aus Eupatorium rotundifolium L. ssp. ovatum (Bigel) Montg. et Fairbr. isolierten 8-Tiglinoyloxypreeupatundin-10,15-epoxids angeben (vgl. auch IMAKURA et al., 1980; Tab. 8, S. 65).

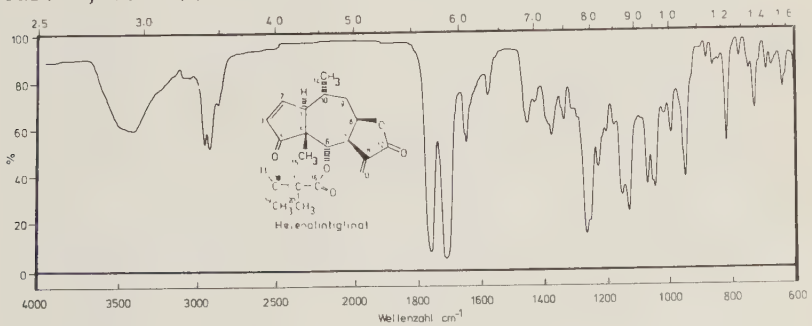


Abb. 17 IR - Spektrum des Helenalintiglinsäureesters

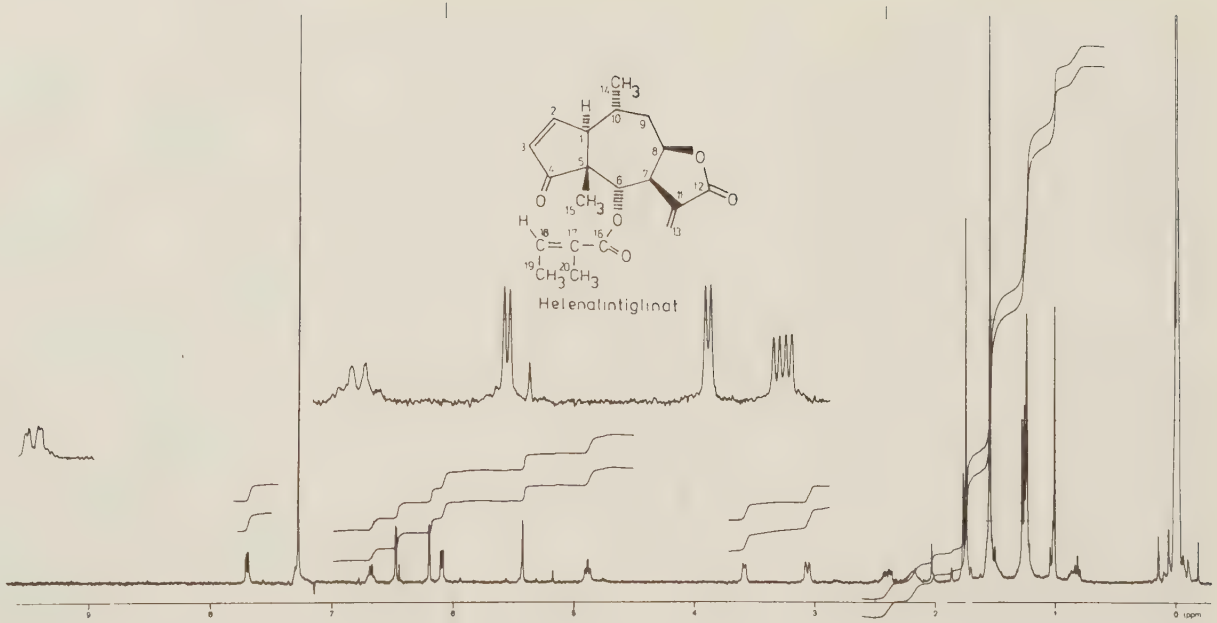


Abb. 18 ^{1}H-NMR-Spektrum von Helenalintiglinsäureester

Tab. 4: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von Helenalintiglinsäureester [360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

	isolierte Verbindung			Literaturwerte für Helenalin[1] und Tiglinsäure[2]		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H - 1	3,047 ddd	1/2	1,9	3,04 ddd	1/2	1,8
H - 2	7,662 dd	1/3	2,8	7,69 dd	1/3	2,7
H - 3	6,071 dd	1/10	11,5	6,08 dd	1/10	11,5
H - 6	5,406 br s	2/3	6,0	5,46 br s	2/3	6,0
H - 7	3,576 m	6/7	< 1	3,59 m	6/7	1
H - 8	4,872 ddd	7/13	2,8	4,90 ddd	7/13	3,0
H - 9	2,367 ddd	7/13'	2,7	2,41 ddd	7/13'	2,7
H - 9'	1,727 ddd	7/8	7,5	1,75 ddd	7/8	7,5
H - 10	2,151 m	8/9	7,4	2,19 m	8/9	7,5
H - 13	6,445 d	8/9'	2,5	6,42 d	8/9'	2,5
H - 13'	6,169 d	9/9'	15,0	6,16 d	9/9'	15,0
C_{10} - Me	1,269 d	9/10	3,3	1,29 d	9/10	3,5
C_5 - Me	1,019 s	9'/10	7,9	1,04 s	9'/10	8,0
H - 18	6,714 m	10/14	6,8	6,73 m	10/14	7,0
C_{17} - Me	1,769 br s	18/19	7,0	1,76 br s	18/19	7,0
C_{18} - Me	1,745 br d	18/10	~ 1	1,75 br d	18/20	1

1) BOHLMANN et al. (1981); 2) BOHLMANN et al. (1977; 1979)

Die Methylgruppe an C-17 lieferte bei 1,74ppm ein breites Singulett, die Methylgruppe an C-18 bei 1,76ppm ein breites Dublett.

Anhand dieser chemischen Verschiebungen der beiden Methylgruppen kann das Vorliegen der isomeren Angelicasäure ausgeschlossen werden, bei der die Signale für die trans-ständigen CH_3-Gruppen stets um 0,2ppm bis 0,3ppm weiter nach tieferem Feld verschoben sind. Die Differenz der chemischen Verschiebungen der Methylgruppensignale zueinander beträgt bei der Angelicasäure zwischen 0,13ppm und 0,14ppm, bei der Tiglinsäure dagegen nur zwischen 0,02ppm und 0,03ppm (BOHLMANN et al., 1977 und 1979).

Durch die spektroskopischen und chromatographischen Analysen ist die isolierte Substanz eindeutig als Helenalintiglinäureester identifiziert, dessen natürliches Vorkommen bislang noch nicht beschrieben ist.

4. Isolierung und Identifizierung von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester und 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester

4.1. GC/MS - Analyse und Reindarstellung durch präparative HPLC

In der gelbgefärbten Teilfraktion IV (2,73 g) traten im DC zwei Sl auf (Abb. 5). Nach weiterer sc Reinigung an Kieselgel mit n-Pentan/Ether (75:25) wurde die viskose Fraktion der Kapillargaschromatographie und der GC/MS -

Analyse zugeführt. Die Auftrennung an einer 15 m langen OV-101-Kapillarsäule zeigte, daß hier neben den bereits identifizierten fünf Helenalinestern der Teilfraktionen III und V (Peak-Nr. 1, 3, 4, 5 und 7; s. Abb. 19) zusätzliche Komponenten auftraten, von denen zwei aufgrund ihrer Massenfragmente als Pseudoguaianolide mit Sauerstofffunktionen an C-4, C-6 und C-8 angesprochen werden konnten (Peak-Nr. 2 und 6; s. Abb. 19).

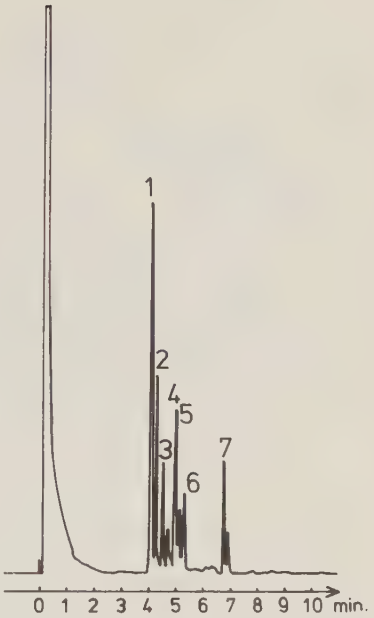


Abb. 19 GC der gereinigten Teilfraktion IV (System II)

1 = Helenalinisobutyrat
3 = Helenalinmethacrylat
4 = Helenalin-2-methylbutyrat
5 = Helenalinisovalerianat
7 = Helenalintiglinat

Die zuerst erscheinende Substanz zeigte einen Molekülpeak bei M^+ = 336 und Fragmente bei m/z = 266 und m/z = 248, die sich aus der Abspaltung der Acylgruppe bzw. der Acylgruppe und Wasser erklären ließen. Im Einklang damit stand der Basispeak mit der Masse m/z = 71, der in Verbindung mit dem Fragment m/z = 43 (Acylrest - CO) die Säurekomponente als eine gesättigte C_4-Säure auswies. Die übrigen Spaltprodukte mit den Massenzahlen m/z = 238, 233, 230, 220, 124, 123, 122, 97 und 95 waren identisch mit den

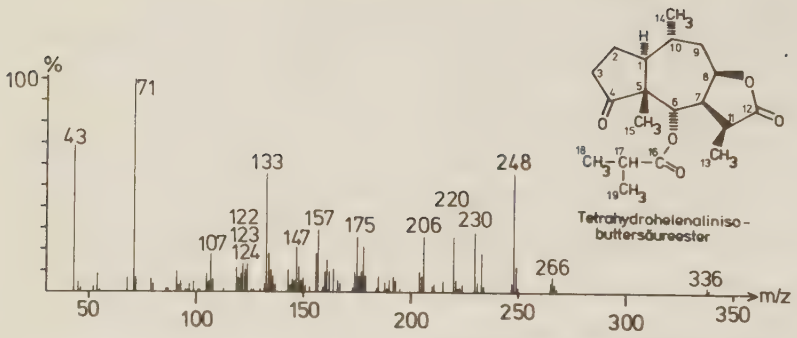


Abb. 20 Massenspektrum von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester

Angaben, die von POPLAWSKI et al. (1971) für Tetrahydrohelenalin gemacht worden sind. Aufgrund des Massenspektrums sollte es sich deshalb um einen Buttersäureester des Tetrahydrohelenalins handeln.

Die zweite Verbindung (Peak-Nr. 6) zeigte einen Molekülpeak bei M^+= 378. Das erste Folgefragment bei m/z = 332 deutete auf die Abspaltung einer Ameisensäure oder von Ethanol aus dem Grundmolekül hin. Die Fragmente bei m/z = 308 und 290 sprachen in Zusammenhang mit dem Basispeak m/z = 71 und dem aus ihm resultierenden Fragment m/z = 43 (Acylrest - CO) für das Vorliegen eines Sl - Esters mit einer gesättigten C_4-Säure. Die Spaltprodukte bei m/z = 262 und m/z = 244 andererseits lassen sich durch die entsprechende Säureabspaltung aus dem ersten Folgefragment m/z = 332 erklären. Das daraus hervorgehende Fragment

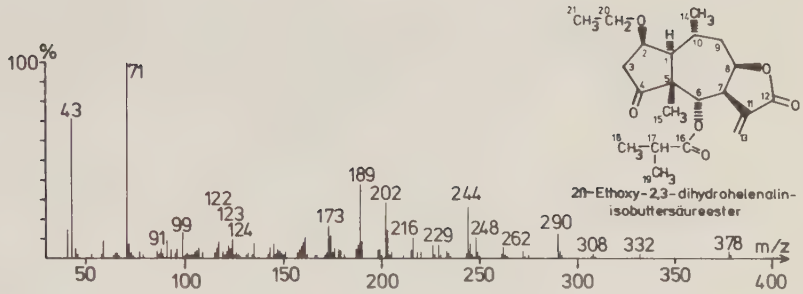


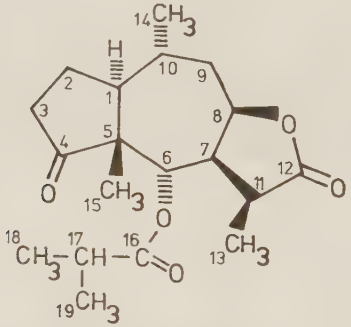
Abb. 21 Massenspektrum von 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester

m/z = 262 besitzt die Masse von Helenalin, dessen Spaltprodukte sämtlich im Spektrum auftraten (vgl. Abb. 21 und Abb. 12, S. 31 bzw. Tab. 11, S. 74). Daraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß es sich bei dieser Verbindung um ein Ethoxy- bzw. Formylderivat des Helenalinisobuttersäureesters handelt und der Alkohol bzw. die Säure an C-2 oder C-3 des Cyclopentanringes lokalisiert ist.

Die beiden Pseudoguaianolidester konnten weder durch SC noch durch präparative DC aus dem Gemisch abgetrennt werden. Deshalb wurde hierfür die präparative HPLC eingesetzt. An einer Kieselgelsäule gelang es mit dem Elutionsmittelgemisch n-Hexan/Isopropanol (92,5:7,5) durch wiederholte Chromatographie 8 mg der zuerst aufgetretenen Komponente (Peak-Nr. 2) und 11 mg der anderen Substanz (Peak-Nr. 6)

zu isolieren. Beide Verbindungen lagen danach gc nahezu einheitlich vor.

4.2. Identifizierung von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester



Tetrahydrohelenaliniso-buttersäureester

Die isolierte Verbindung (M^+= 336) kristallisierte aus Ether/Petrolether aus und schmolz bei 113° - 116,5°C. Das IR - Spektrum (Abb. 22) zeigte die Bande für die Carbonylfunktion des Lactonringes bei 1772 cm^{-1} und das Signal für eine Esterfunktion bei 1724 cm^{-1}. Eine weitere Carbonylbande trat bei 1741 cm^{-1} auf, deren Lage für ein nicht konjugiertes Keton am Cyclopentanring spricht [s. die Ergebnisse von ADAMS u. HERZ (1949) aus vergleichenden Untersuchungen an Helenalin und Tetrahydrohelenalin]. Signale für eine Exomethylengruppe am γ-Lactonring oder eine Doppelbindung in Konjugation zur Carbonylgruppe des Cyclopentenonringes waren im Spektrum nicht vorhanden.

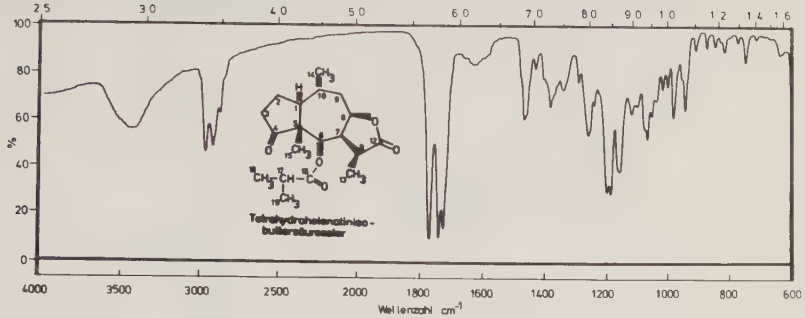


Abb. 22 IR - Spektrum des Tetrahydrohelenalinisobuttersäureesters

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 23) der isolierten Verbindung zeigte die chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmuster, die von POPLAWSKI et al. (1971) für Tetrahydrohelenalin und seinen synthetisierten Essigsäureester angegeben werden. In Tab. 5 sind die Werte diesen Angaben gegenübergestellt. Bei den darüber hinaus auftretenden beiden Dubletts bei 1,099ppm und 1,078ppm handelt es sich um die Signale der nicht äquivalenten Methylgruppen der Isobuttersäure, deren α-ständiges Proton bei 2,45ppm lokalisiert ist. Diese chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsbilder entsprachen denen der Isobuttersäure in 11,13-Dihydrohelenalinisobutyrat (Arnicolid C; POPLAWSKI et al., 1971; s. auch Tab. 3, S. 35).

Damit ist die Struktur der isolierten Verbindung als Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester geklärt, dessen natürliches Vorkommen bisher noch nicht beschrieben worden ist.

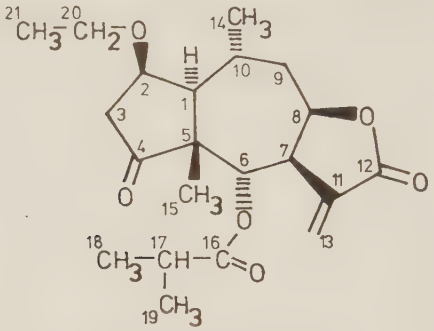
Abb. 23 ^{1}H-NMR-Spektrum von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester

Tab. 5: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester; [360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

	isolierte Verbindung			Literaturwerte für Tetrahydrohelenalin[1] u. Isobuttersäure[1]		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H - 1	bei 2,4	1/10	10,5	-	1/10	-
H - 6	5,350 br s	6/7	< 1	5,37 s	6/7	0
H - 7	2,751 m	7/11	10,5	2,78 m	7/11	11
H - 8	4,704 ddd	7/8	6,4	4,70 ddd	7/8	6,5
H - 9	bei 2,3	8/9	6,4	2,32 ddd	8/9	6,5
H - 9'	1,634 ddd	8/9'	1,7	1,56 ddd	8/9'	-
H - 10'	2,099 m	9/9'	15,0	2,14 m	9/9'	15,0
H - 11	3,015 m	9/10	-	3,02 m	9/10	-
C_{11} - Me	1,465 d	9'/10	10,5	1,47 d	9'/10	11,0
C_{10} - Me	1,049 d	10/14	6,5	1,06 d	10/14	6,5
C_5 - Me	0,838 s	11/13	7,1	0,83 s	11/13	7,0
H - 17	2,435 m	17/18	7,1	-	17/18	7,1
C_{17} - Me	1,099 d	17/19	7,1	1,08 d	17/19	7,1
C_{17} - Me'	1,076 d			1,04 d		

1) POPLAWSKI et al. (1971)

4.3. Identifizierung von 2ß-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalin-isobuttersäureester



2ß-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalin-isobuttersäureester

Die isolierte Verbindung (M^+= 378) kristallisierte in Nadeln, die bei 141° - 143°C schmolzen. Das im UV - Spektrum auftretende Maximum bei 214 nm deutete auf eine Exomethylengruppe am γ-Lactonring hin, deren Signale im IR - Spektrum (Abb. 24) bei 3100 cm^{-1} (schwach), 1658 cm^{-1}, 1270 cm^{-1} und 820 cm^{-1} erschienen. Die Carbonylgruppe des Lactonringes trat als Signal bei 1765 cm^{-1} auf. Eine zweite Carbonylbande bei 1741 cm^{-1} ist der Ketogruppe im Cyclopentanring zuzuordnen (ADAMS u. HERZ, 1949; vgl. auch Abb. 22) und die Bande bei 1727 cm^{-1} einer Esterfunktion. Bei 1295 cm^{-1} und 1085 cm^{-1} traten Signale für eine Ethergruppierung auf, so daß es sich bei dem im MS eliminierten Bruchstück der Masse 46 um den Ethylalkohol und nicht um die Ameisensäure handeln sollte. Im Einklang mit dem Auftreten der Ethoxygruppe in der Molekel steht weiterhin die

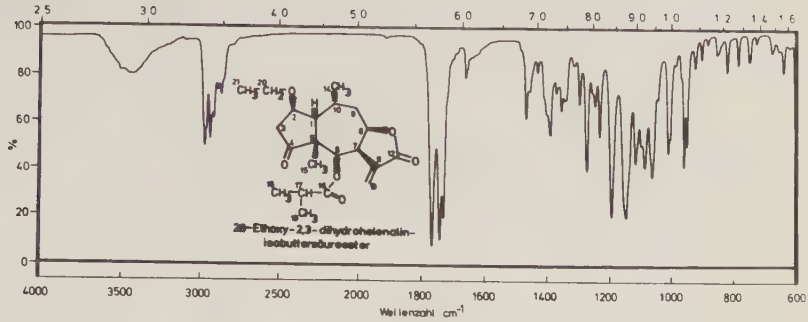


Abb. 24 IR - Spektrum von 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalin-isobuttersäureester

IR - Bande bei 2865 cm^{-1}, die der $-CH_2$-Gruppe des -O-Ethyl-substituenten zugeordnet werden kann (WILLIAMS u. FLEMING, 1975; HESSE et al., 1979). IR - und Massenspektrum legen somit für die isolierte Verbindung die Struktur eines 2- oder 3-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureesters nahe.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 25; Tab. 6, S. 53) erschienen die Signale der Protonen der Exomethylengruppe am γ-Lactonring, der Methylgruppen an C-5 und C-10 sowie die der Protonen des Siebenringes und der Isobuttersäure mit den bei Helenalinisobutyrat gefundenen chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsbildern (vgl. Tab. 3, S. 35). Von dieser Verbindung abweichende Signale für die Ringprotonen des Pseudoguaianolidgerüstes traten wie erwartet nur für die Protonen an C-1, C-2 und C-3 des Cyclopentanringes auf. Die Signale für die Doppelbindungsprotonen des Helenalins an C-2

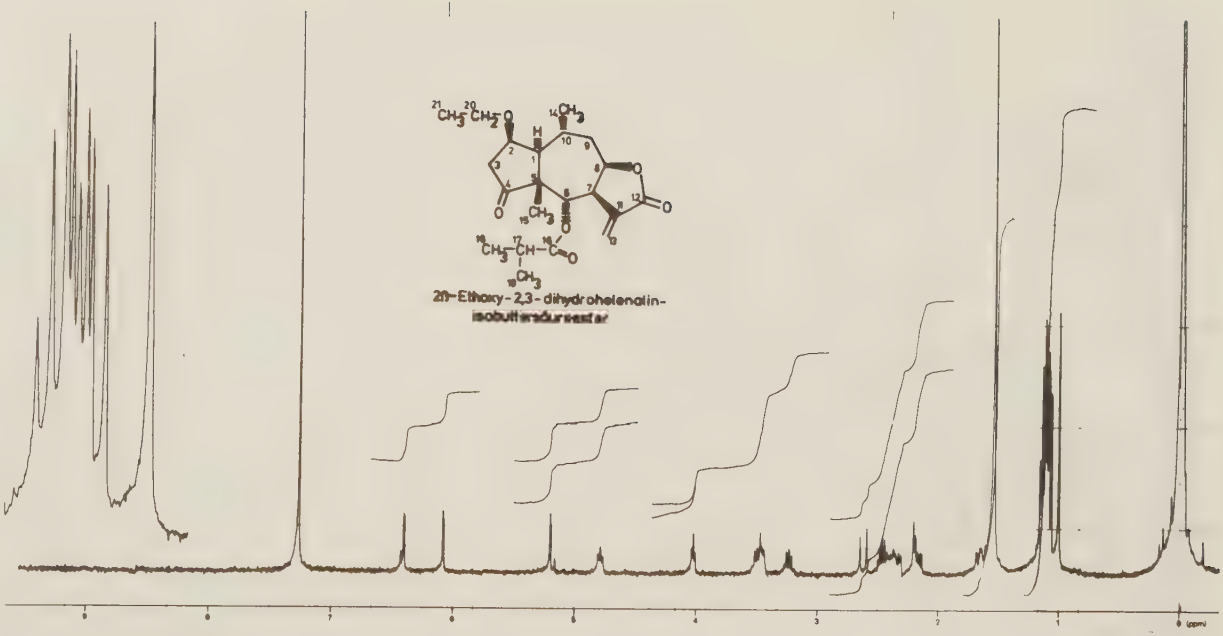


Abb. 25 ^{1}H-NMR-Spektrum von 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester

Tab. 6: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester

[360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

Protonen	δ	J	Hz
H - 1	bei 2,40	1/2	5,0
H - 2	4,035 dd	2/3	6,0
H - 3	2,634 d	2/3	~ 0
H - 3'	2,218 dd	3/3	19,7
H - 6	5,216 br s	6/7	< 1
H - 7	bei 3,46 m	7/8	7,5
H - 8	4,806 ddd	7/13	2,4
H - 9	bei 2,35	7/13'	2,2
H - 9'	1,662 ddd	8/9	8,0
H - 10	bei 2,20	8/9'	2,0
H - 13	6,412 d	9/10	3,0
H - 13'	6,093 d	9'/10	10,5
C_{10} - Me	1,131 d	9/9'	15,0
C_5 - Me	1,022 s	10/14	7,0
H - 17	2,459 m	17/18	6,9
C_{17} - Me	1,110 d	17/19	6,9
C_{17} - Me'	1,090 d		
H - 20	bei 3,2 u. 3,4	20/21	7,0
C_{20} - Me	1,156 t		

und C-3 waren im Spektrum nicht vorhanden. Stattdessen trat bei 4,035ppm ein 1H-Signal als Triplett auf, welches aus den Halbwertsbreiten als Doppeldublett mit zwei etwa gleich großen Kopplungskonstanten interpretiert werden konnte. Aufgrund der chemischen Verschiebung sollte es sich hier um das Proton handeln, das an demselben C-Atom lokalisiert ist wie die Ethoxygruppierung. Gleichzeitig zeigte das Spektrum bei 2,634ppm und 2,218ppm zwei weitere 1H-Signale als Dublett (J = 19,7 Hz) bzw. als Doppeldublett (J = 19,7 Hz und J = 6 Hz).

Danach sollte die Ethoxygruppe an C-2 lokalisiert sein. Stünde dieser Substituent an C-3, müßten für die Protonen an C-2 Aufspaltungsmuster auftreten, die aus jeweils drei Kopplungen resultieren (eine geminale Kopplung sowie je eine vicinale Kopplung zu H-1 und H-3). Die dem absoluten Betrag nach große geminale Kopplung von 19,7 Hz in den Signalen bei 2,634ppm und 2,218ppm ist darüber hinaus typisch für Methylenprotonen in Nachbarschaft zu einer π-Bindung (GÜNTHER, 1973). Das bedeutet, daß diese Protonen an C-3 lokalisiert sind, was die Stellung des Ethoxysubstituenten an C-2 zusätzlich erhärtet.

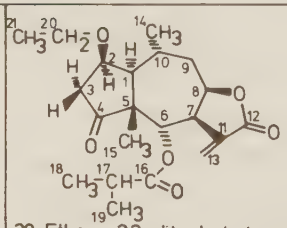
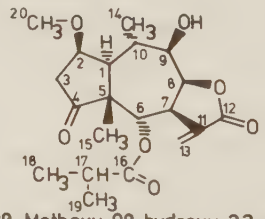
Die räumliche Orientierung der Ethoxygruppe ergibt sich aus den Kopplungsgrößen von H-2 zu H-1 und den Protonen an C-3. Wie sich am Dreidingmodell zeigen läßt, ist das gefundene Aufspaltungsmuster für H-2 nur erklärbar, wenn die Ethoxygruppe β-orientiert ist. Im Modell findet man einen Winkel von annähernd 90° zwischen H-2α und einem

Proton an C-3, nämlich H-3β, während die Winkel zwischen H-2α und H-1 sowie zwischen H-2α und H-3α nahezu gleich groß sind. Dies erklärt, daß H-3β nur als Dublett und H-2α als Doppeldublett mit etwa gleich großen Kopplungskonstanten im Spektrum erscheinen. Bei einer α-Substitution an C-2 wäre keine Kopplung mit ca. 0 Hz möglich. H-2β und H-3β sollten komplizierter aufspalten.

Gestützt wird dieses Ergebnis durch die Angaben der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der C-2 und C-3-Protonen des 2β-Methoxy-9β-hydroxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureesters (DOMINGUEZ et al., 1980), die hiermit identisch sind (s. Tab. 7). Bei dem an C-2 α-substituierten Diacetylflorigrandin aus Hymenoxys grandiflora (HERZ et al., 1974) findet man dagegen wie erwartet für das β-ständige Proton H-2 ein kompliziertes Aufspaltungsmuster für drei vicinale Kopplungen (^3J = 8 Hz, 8 Hz, 7 Hz). Es ist so in diesem Falle möglich, eine sichere Zuordnung der Konfiguration über die ^3J-Werte zu treffen, obwohl dies bei Cyclopentanderivaten generell sehr schwierig ist (GÜNTHER, 1973; PRETSCH et al., 1976).

Die CH_3-Gruppe des Ethoxysubstituenten erschien als Triplett bei 1,156ppm (J = 7 Hz), während die Signale der nicht äquivalenten CH_2-Protonen als Multipletts im Bereich von 3,2ppm und 3,4ppm auftraten, was durch Einstrahlungen auf diesen Bereich abgesichert wurde.

Tab. 7: Vergleich der ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) der Protonen des Fünfringes in 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester und 2β-Methoxy-9β-hydroxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester (DOMINGUEZ et al., 1980; [360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; d: Dublett; m: Multiplett]

	 2ß-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester			 2ß-Methoxy-9ß-hydroxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester 1)		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H-1	bei 2,40	1/2	5	2,43 m	1/2	5
H-2α	4,035 dd	2α/3α	6	4,02 dd	2α/3α	6
H-3α	2,218 dd	2α/3ß	~0	2,18 dd	2α/3ß	~0
H-3ß	2,634 d	3α/3ß	19,7	2,68 d	3α/3ß	19

1) DOMINGUEZ et al. (1980)

Damit ist die Struktur dieser Verbindung als 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester bewiesen, der bisher in der Literatur nicht beschrieben ist.

5. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalinisobutter-, -α-methacryl- und -tiglinsäureester

5.1. GC und GC/MS - Analyse der gereinigten Teilfraktion VII

In der bei der Fraktionierung des S1 - Extraktes anfallenden Teilfraktion VII (0,77 g) ließ sich dc in mehreren Systemen nur eine S1 - Komponente nachweisen, die mit den mitchromatographierten Arnicoliden C und D (11,13-Dihydrohelenalinisobutter- und -α-methacrylsäureester) auf einer Höhe lag (Abb. 4, S. 17 und Abb. 5, S. 19). Diese Substanz wurde durch wiederholte SC an Kieselgel weiter gereinigt und im GC untersucht. An der OV-101-Kapillarsäule trennte sie sich in drei Komponenten auf, von denen zwei dieselben Retentionszeiten wie die Arnicolide C u. D aufwiesen (Abb. 26, Peak-Nr. 1 und 2). Die nach GC/MS - Analyse erhaltenen Massenspektren zeigten die entsprechenden Molekülpeaks (M^+= 334 bzw. M^+= 332) und das bekannte Fragmentierungsmuster dieser beiden Verbindungen (Abb. 27 und 28, Tab. 12, S. 75), was

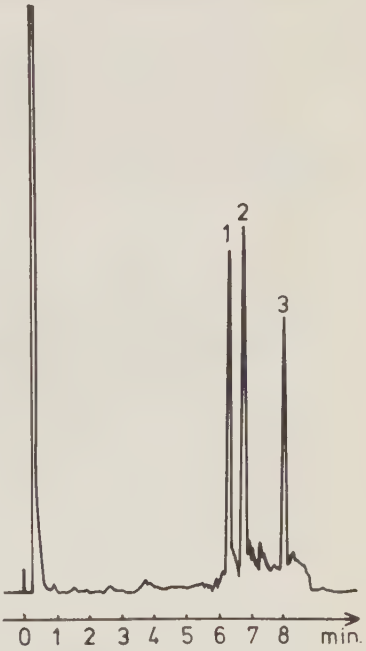


Abb. 26 GC der gereinigten Teilfraktion VII (System I)

1 = Dihydrohelenalinisobut.

2 = Dihydrohelenalinmethac.

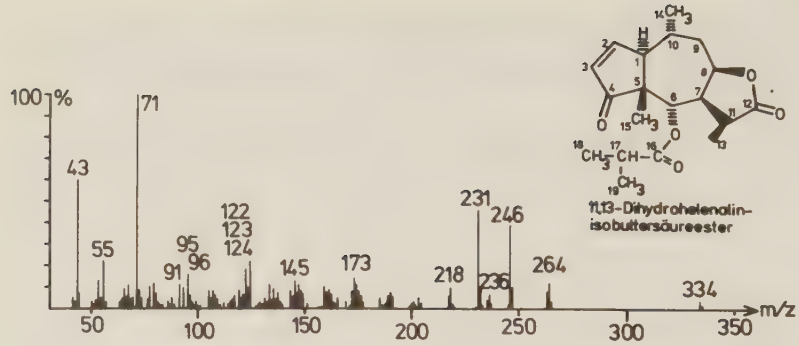


Abb. 27 Massenspektrum von 11,13-Dihydrohelenalinisobutyrat

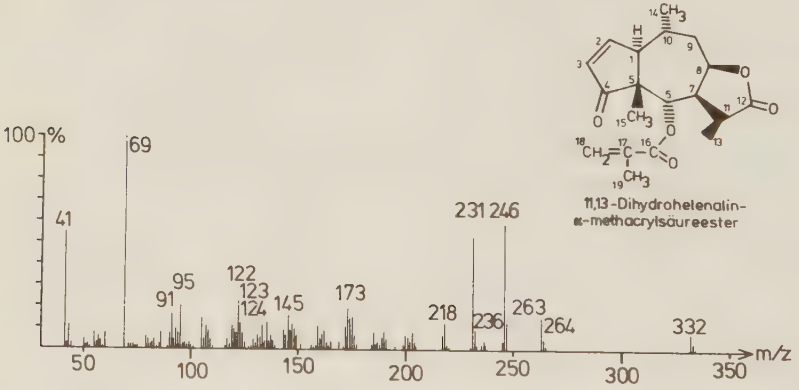


Abb. 28 Massenspektrum von 11,13-Dihydrohelenalinmethacrylat

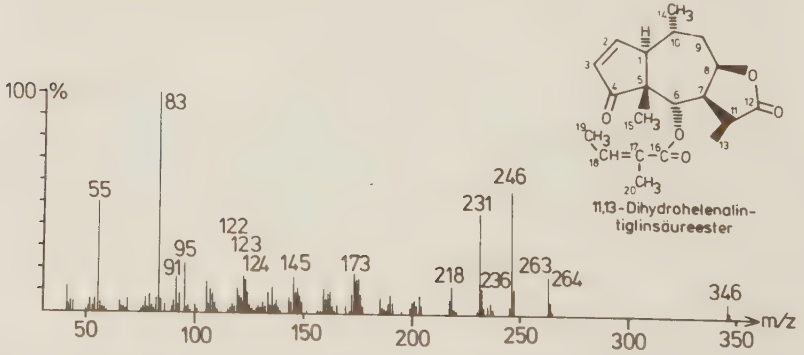


Abb. 29 Massenspektrum von 11,13-Dihydrohelenalintiglinat

durch direkten Vergleich mit den gleichzeitig aufgenommenen Spektren dieser Verbindungen bestätigt wurde.

Die dritte Komponente war gc mit einer Verunreinigung in dem aus Arnikablättern isolierten 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester (Arnicolid B) identisch, der ebenfalls als Vergleichssubstanz zur Verfügung stand. Das Massenspektrum der Verbindung zeigte einen Molekülpeak bei M^+= 346 und das typische Fragmentierungsmuster eines Dihydrohelenalinesters (Abb. 29, Tab. 12, S. 75). Die nach Abspaltung der Acylgruppe und Wasser auftretenden Fragmente m/z = 264 und 263 bzw. 246 und die charakteristischen Spaltprodukte m/z = 95, 96, 122, 123 und 124 wiesen, wie bei den Helenalinestern (s. S. 29f) und auf S. 71ff diskutiert, aufgrund ihrer relativen Intensitäten auf eine Säure ohne α-ständiges Proton hin, deren Acylrest mit der Masse m/z = 83 den Basispeak bildete. Danach sollte es sich bei der Säure um die Tiglin- oder Angelicasäure handeln. Das Massenspektrum der als Verunreinigung in der Vergleichssubstanz Arnicolid B auftretenden Substanz war identisch mit dem Spektrum dieser Verbindung, so daß diese auch in den Blättern von A. montana vorkommt.

5.2. GC - Identifizierung der Säurekomponenten der 11,13-Dihydrohelenalinester

Zur Klärung der Frage, um welche der möglichen isomeren Säuren es sich bei dem neuen Arnicolid handelt, wurden 25 mg der gereinigten Teilfraktion VII nach einer Vorschrift von

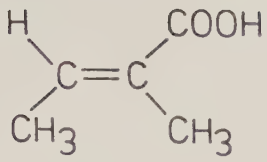
EVSTRATOVA et al. (1969) alkalisch hydrolysiert, und das angesäuerte Hydrolysat wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus der Chloroformphase wurden die Säuren mit Sodalösung ausgeschüttelt und hieraus nach Ansäuern mit Chloroform ausgezogen. Die Auftrennung der Säuren erfolgte an einer 12 m langen Carbowax 20 M - Kapillarsäule. Im Chromatogramm erschienen drei Säuren, die nach Zuspritzen der Vergleichsverbindungen mit Isobuttersäure, α-Methacrylsäure und Tiglinsäure identisch waren (s. Abb. 30). Zu Vergleichszwecken wurde die im Handel nicht erhältliche Angelicasäure aus der isomeren Tiglinsäure nach einer Vorschrift von BUCKLES u. MOCK (1950) über Bromierung zur α,β-Dibromo-α-methylbuttersäure hergestellt (s. Exp. Teil, S. 157). Im GC (RT 4,60 Min.) unterschied sie sich, wie auch die isomere Seneciosäure (RT 4,75 Min.; s. Abb. 31) von

Abb. 30 GC der nach Hydrolyse aus Fraktion VII gewonnenen Säuren

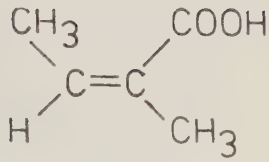
1 = Isobuttersäure (RT 2,88 Min.)

2 = α-Methacrylsäure (RT 3,75 Min.)

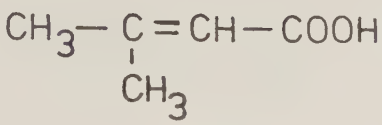
3 = Tiglinsäure (RT 5,50 Min.)



Tiglinsäure



Angelicasäure

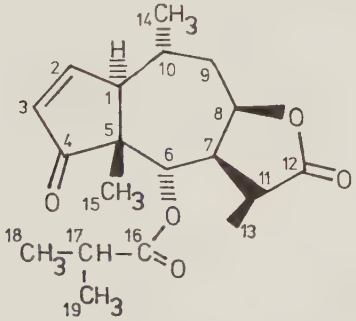


Seneciosäure

Abb. 31 Isomere einfach ungesättigte C_5-Säuren

der Tiglinsäure, sodaß es sich bei dem dritten 11,13-Dihydrohelenalinester um den Tiglinsäureester handeln muß.

5.3. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalinisobuttersäureester



11,13-Dihydrohelenalin-isobuttersäureester

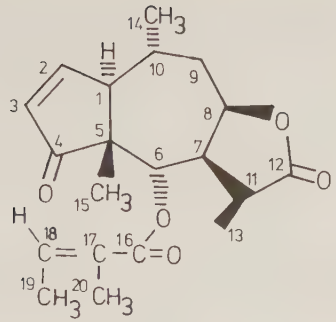
Aus der Teilfraktion VII wurden von der nach der GC/MS - Analyse mit 11,13-Dihydrohelenalinisobuttersäureester identischen Verbindung durch präparative HPLC an einer Kiesel-

gelsäule 18 mg gc einheitlich abgetrennt. Die aus Ether/ Petrolether umkristallisierte Substanz schmolz bei 139° - 140,5°C, die optische Drehung betrug $[\alpha]_D^{20} = -90°$. Beide Konstanten stimmten mit denen von Dihydrohelenalinisobutyrat (POPLAWSKI et al., 1971) überein, ebenso die Signale des IR - Spektrums (Carbonyl am Cyclopentenring bei 1710 cm^{-1}, Doppelbindung des Cyclopentenrings bei 1578 cm^{-1}, Carbonyl der Estergruppe und des γ-Lactonringes bei 1728 cm^{-1} und 1758 cm^{-1}). Das UV - Maximum lag bei 227 nm (ϵ = 8863).

Im ^{1}H-NMR-Spektrum fehlten die für eine Exomethylengruppe am γ-Lactonring charakteristischen Dubletts. Dafür trat bei 1,51ppm ein Dublett als Signal der Methylgruppe an C_{11} auf. Im Einklang damit stand die Lage des Protonensignals für H-7 bei 2,80ppm, das hier in höherem Feld als bei den Helenalinestern erscheint. Alle Signale des Spektrums standen in Einklang mit den Angaben von POPLAWSKI et al. (1971) für Dihydrohelenalinisobutyrat (vgl. Tab. 3, S. 35). Damit ist das Vorkommen dieses Arnicolids auch für die Blütenkörbchen von A. montana bewiesen.

5.4. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureester

Der α-Methacrylsäure- und Tiglinsäureester von 11,13-Dihydrohelenalin trennten sich auf der präparativen HPLC - Säule nur unvollständig (s. Abb. 51, S. 145). Beide Ester wurden deshalb bei der Isolierung des Isobuttersäureesters aus dem Gemisch zunächst gemeinsam aufgefangen. Weitere Versuche zu einer besseren Trennung der beiden Verbindungen



11,13-Dihydrohelenalin-tiglinsäureester

schlugen fehl. Durch wiederholte präparative HPLC gelang es jedoch 12 mg des Dihydrohelenalintiglinats aus dem Zweikomponentengemisch gc einheitlich abzutrennen, während der Methacrylsäureester weiterhin mit dem Tiglinsäureester zusammen anfiel. Der farblose, viskose Ester war nicht zur Kristallisation zu bringen. Im UV - Spektrum erschien ein Maximum bei 222 nm. Die optische Drehung betrug $[\alpha]_D^{20} = -86{,}7^{\circ}$ (c = 0,75; Methanol) und stimmte mit der von LEE et al. (1977) und IMAKURA et al. (1980) für Dihydrohelenalintiglinat (= Microhelenin C) angegebenen überein ($[\alpha]_D^{20} = -85^{\circ}$; Methanol).

Im IR - Spektrum (Abb. 32) erschien bei 1772 cm^{-1} die Carbonylfunktion des γ-Lactonringes. Bei 1720 cm^{-1} trat die Bande für die Esterfunktion auf, die, wie auch bei anderen Dihydrohelenalinestern (POPLAWSKI et al., 1971; IMAKURA et al., 1980), von der Carbonylfunktion des Cyclopentenonringes bei 1712 cm^{-1} teilweise überlagert wird. Die Doppelbindung des Cyclopentenonringes zeigte ein Signal bei

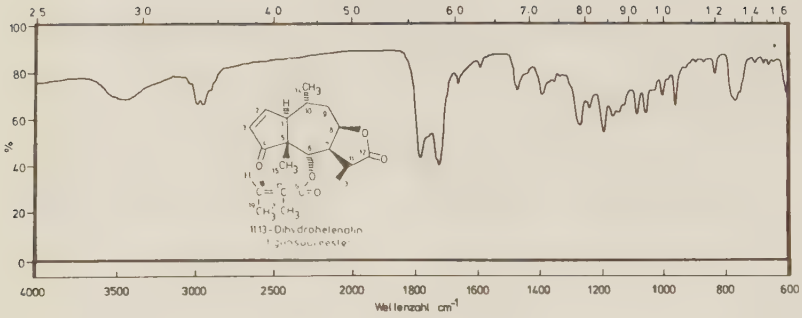


Abb. 32 IR - Spektrum des 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureesters

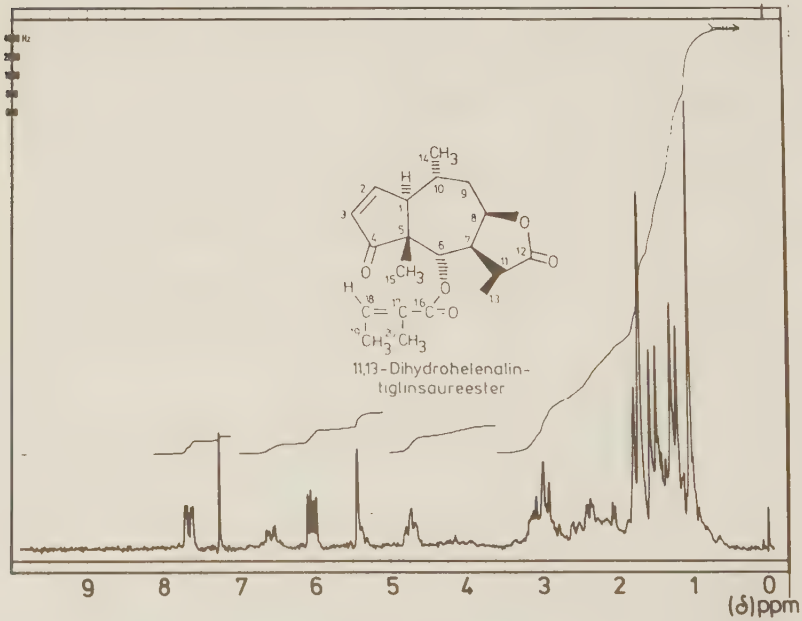


Abb. 33 ^{1}H-NMR-Spektrum des 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureesters

Tab. 8: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureester

[80 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

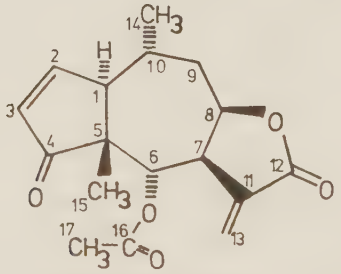
	isolierte Verbindung			Literaturwerte für Microhelenin C[1] (Dihydrohelenalintiglinat)		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H - 1	3,03 m	1/2	2,0	-	1/2	2,0
H - 2	7,66 dd	1/3	3,0	7,76 dd	1/3	3,0
H - 3	6,05 dd	1/10	10,0	6,06 dd	1/10	-
H - 6	5,44 br s	2/3	6,0	5,46 br s	2/3	6,0
H - 7	-	6/7	1	-	6/7	1
H - 8	4,74 ddd	7/11	-	4,78 m	7/11	-
H - 9	2,43 ddd	7/8	6,0	-	7/8	-
H - 9'	-	8/9	6,1	-	8/9	-
H - 10	-	8/9'	2,5	-	8/9'	-
H - 11	bei 3,03	9/9'	15,0	-	9/9'	15,0
C_{11} - Me	1,54 d	9/10	2,0	1,50 d	9/10	-
C_{10} - Me	1,25 d	9'/10	-	1,25 d	9'/10	-
C_5 - Me	1,06 s	10/14	6,2	1,05 s	10/14	6,0
H - 18	6,59 m	11/13	7,0	6,64 m	11/13	6,0
C_{17} - Me	1,75 br s	18/19	6,7	1,74 br s	18/19	7,0
C_{18} - Me	1,73 d	18/20	1	1,73 d	18/10	-

1) IMAKURA et al. (1980); LEE et al. (1977)

1578 cm^{-1}. Die Bande bei 1649 cm^{-1} wird von der Doppelbindung in der Säurekomponente hervorgerufen, die auch die Signale bei 1182 cm^{-1} und 1260 cm^{-1} verursacht (IMAKURA et al., 1980; BOHLMANN et al., 1977).

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 33) zeigte die für 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureester zu erwartenden Signale und stimmte mit den Angaben von LEE et al. (1977) u. IMAKURA et al. (1980) für diese Verbindung überein (Tab. 8). Dieser als Microhelenin C bereits beschriebene 11,13-Dihydrohelenalintiglinsäureester ist somit auch Inhaltsstoff der Blütenkörbchen und Blätter von A. montana und kann als neues Arnicolid bezeichnet werden.

6. Isolierung und Identifizierung von Helenalinessigsäureester



Helenalinacetat

Bereits bei der ersten Fraktionierung des S1 - Gesamtextraktes fielen in der Fraktion IX (Abb. 5, S. 19) Kristalle an, die nach Waschen mit n-Pentan aus Ether umkristallisiert

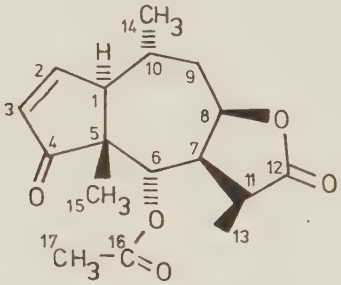
wurden. Die gc reine Verbindung war dc und gc, sowie nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, spezifischer Drehung, UV-, IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Spektren (Tab. 9; vgl. auch Tab. 11, S. 74 und Exp. Teil, S. 193) identisch mit Helenalinacetat, das bereits von LIST u. FRIEBEL (1974) aus den Blütenkörbchen von A. montana isoliert worden war und als Vergleichssubstanz zur Verfügung stand.

Tab. 9: Physikalische Konstanten von Helenalinacetat

	isolierte Verbindung	Literatur[1)]
Molekülpeak, M^+	304	304
CH - Analyse	Gef.: C, 67,01; H, 6,69; O, 26,30 Ber.: C, 67,09; H, 6,63; O, 26,28	
Summenformel	$C_{17}H_{20}O_5$	$C_{17}H_{20}O_5$
UV - Spektrum λ max	220 nm; ϵ = 12650	219 nm; ϵ = 12821
Schmelzpunkt	181° - 183°C	178° - 181°C
$[\alpha]_D^{20}$	-92,5° (c=1,5; Aceton)	-91,7° (Aceton)

1) WILLUHN u. HERRMANN (1979)

7. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalinessigsäureester



11,13-Dihydrohelenalinacetat

In der nach Trennung der S1 - Gesamtfraktion erhaltenen Fraktion X (Abb. 5, S. 19) befand sich ein S1, das im DC mit 11,13-Dihydrohelenalinessigsäureester identisch war. Dieses kristallisierte beim Stehen der Fraktion aus und konnte durch Umkristallisation aus Ether weiter gereinigt werden. Die Identität mit dieser Verbindung, die bereits von LIST u. FRIEBEL (1974) aus den Blütenkörbchen von A. montana isoliert worden ist, wurde durch GC, Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, UV-, IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Spektren bewiesen (Tab. 10; vgl. Tab. 12, S. 75 u. Exp. Teil, S. 153).

Tab. 10: Physikalische Konstanten von 11,13-Dihydrohelenalinacetat

	isolierte Verbindung	Literatur[1)]
Molekülpeak, M^+	306	306
CH - Analyse	Gef.: C, 66,50; H, 7,30; O, 26,20 Ber.: C, 66,66; H, 7,19; O, 26,15	
Summenformel	$C_{17}H_{22}O_5$	$C_{17}H_{22}O_5$
UV - Spektrum λ max	226 nm; ϵ = 8080	226 nm; ϵ = 8078
Schmelzpunkt	177° - 178,5°C	176° - 178°C
$[\alpha]_D^{20}$	-109,8° (c=1,8; $CHCl_3$)	-107° ($CHCl_3$)

1) WILLUHN u. HERRMANN (1979)

8. Identifizierung von Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin

In der Fraktion XII (Abb. 5, S. 19) wurden im DC zwei Sl detektiert, die in Laufhöhe und Anfärbung mit Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin übereinstimmten. Die Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4 ergab, daß diese Fraktion noch sehr stark mit Begleitstoffen verunreinigt war. Versuche, diese durch wiederholte SC an Kieselgel abzutrennen, waren erfolglos.

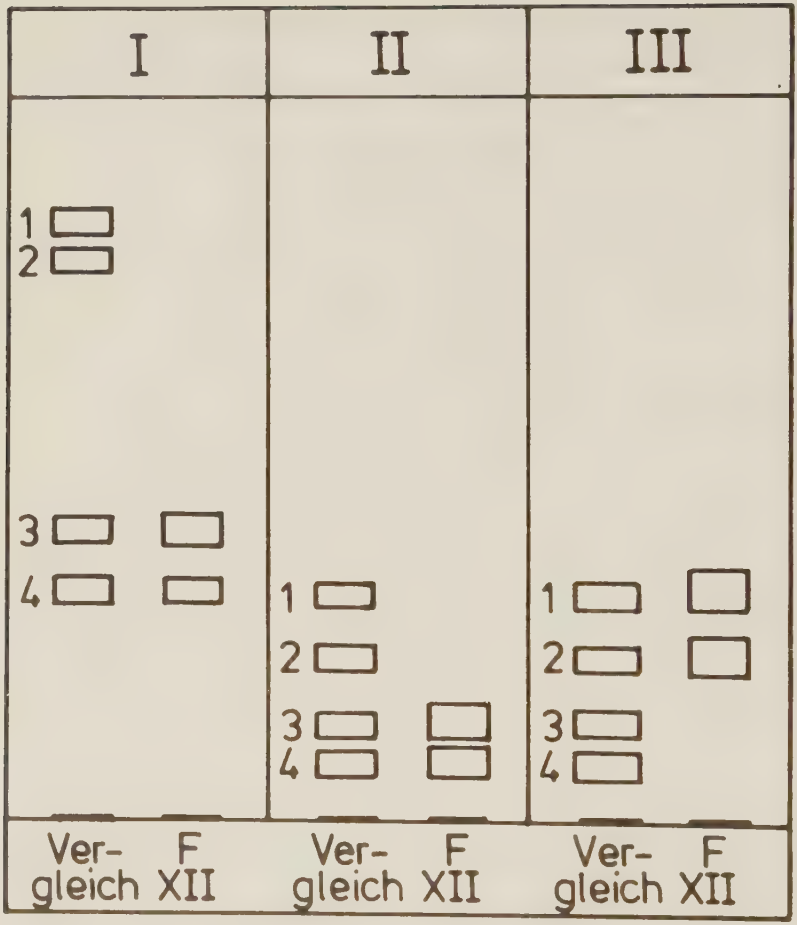


Abb. 34 Nachweis von Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin vor und nach Acetylierung

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
Detektion: ZIMMERMANN - Reagenz
I : Chloroform/Aceton (60:10) vor Acetylierung
II : n-Pentan/Ether (32:68) vor Acetylierung
III : n-Pentan/Ether (32:68) nach Acetylierung
1 = Helenalinacetat; 2 = Dihydrohelenalinacetat;
3 = Helenalin; 4 = Dihydrohelenalin

Da eine GC - Analyse von Helenalin und seinem Dihydroderivat ohne Derivatisierung nicht möglich war, wurde die Fraktion nach einer Vorschrift von LEE et al. (1973) in ihrer Gesamtheit acetyliert. Im DC stimmten beide Verbindungen danach mit Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinacetat überein (Abb. 34). Auch im GC waren sie identisch mit den authentischen Vergleichssubstanzen. Zusätzlich wurde eine GC/MS - Analyse durchgeführt; die Massenspektren wiesen die beiden Verbindungen eindeutig als Helenalin- und Dihydrohelenalinacetat aus. Damit ist das Vorkommen auch der freien Alkohole Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin in den Blütenkörbchen von A. montana nachgewiesen.

III. Fragmentierungsmuster von Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinestern im Massenspektrum in Abhängigkeit von ihren Säurekomponenten

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß sich in der GC/MS - Analyse ein schneller Weg für die Identifizierung der Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester eröffnet. Beide Verbindungsgruppen gehören zu den Pseudoguaianoliden mit Sauerstoffunktionen an C-4, C-6 und C-8 sowie einer Doppelbindung im fünfgliederigen Ring. Im Massenspektrum bilden sie charakteristische Fragmente bei m/z = 95, 96, 122, 123 und 124 (TSAI et al., 1969). Abbildung 35 zeigt am Beispiel von Helenalin und Helenalinacetat einen Bildungsweg dieser Fragmente, wie er von TSAI et al. (1969) aufgrund

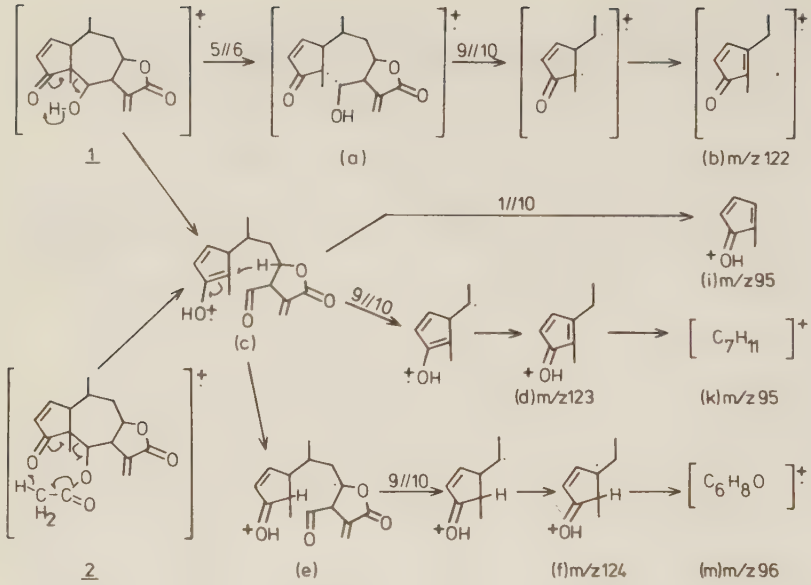


Abb. 35 Fragmentierung von Helenalin u. Helenalinacetat nach TSAI et al. (1969)

von Hochauflösungsspektren und deuterierten Derivaten formuliert worden ist. Die fünf genannten Fragmente resultieren alle aus dem Cyclopentenonring. Die Ringspaltung zwischen C-5 und C-6 und der anschließende Bruch zwischen C-9 und C-10 führen beim freien Alkohol und auch beim veresterten Molekül zum Fragment m/z = 122 (b). Bei der Bildung des Spaltproduktes m/z = 123 (d) ist diese Fragmentierung mit einem Protonentransfer zum Carbonyl an C-4 verbunden, das von der Hydroxylgruppe (freie Verbindung) bzw. aus der Acetylgruppe stammt. Die Entstehung des Fragments m/z = 124 resultiert aus einem zusätzlichen Protonenübergang

aus dem Spaltprodukt (c), bei dem es sich vor allem um das Proton an C-8 handelt, obwohl in geringem Maße hier auch von anderer Stelle eine Protonenwanderung stattfinden kann (TSAI et al., 1969). Die auf diesem Wege gebildeten Bruchstücke m/z = 123 (d) und m/z = 124 (f) sind die Ausgangsfragmente bei der Entstehung der Spaltprodukte m/z = 95 (k) und m/z = 96 (m), die hieraus durch Decarbonylierung (k) bzw. Abspaltung der C_2H_4-Gruppe (m, Bruch zwischen C-1 und C-10) entstehen.

In den Massenspektren der identifizierten Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester waren bei den Fragmenten m/z = 124 und 122 bzw. m/z = 96 und 95 auffallende Intensitätsunterschiede zu beobachten. Bei den Estern mit gesättigter Säure erschien jeweils das Fragment m/z = 124 mit größerer Intensität als m/z = 122, während im Falle einer ungesättigten Säurekomponente (α-Methacryl- und Tiglinsäure) m/z = 124 in viel geringerer Stärke anfiel und das Bruchstück m/z = 122 dadurch dominierte (s. Tab. 11 bzw. Tab. 12). Ähnliche Intensitätsunterschiede traten bei den Bruchstücken m/z = 261 und 262 (Helenalinester) und m/z = 263 und 264 (Dihydrohelenalinester) auf, die jeweils aus der Abspaltung der Säure als Acylrest bzw. als ungeladenes Ketenderivat resultieren (IMAKURA et al., 1980). Bei den Estern mit gesättigten Säuren dominieren hier die Fragmente m/z = 262 bzw. 264 (Ketenabspaltung), bei den Estern mit der ungesättigten α-Methacrylsäure und Tiglinsäure dagegen die Bruchstücke m/z = 261 bzw. 263 (Abspaltung als Acylrest; s. Tab. 11 bzw. Tab. 12).

Tab. 11: Fragmente und relative Intensitäten (%) der isolierten Helenalinester im Massenspektrum (Basispeak: Acylrest)

m/z \ M^+ (%)	Helenalin - acetat 304 (3)	isobu 332 (5)	isoval 346 (5)	mebut 346 (5)	meac 330 (4)	tiglinat 344 (4)
262	18	14	26	19	5	3
261	7	8	6	5	9	8
244	76	81	90	84	53	85
234	9	9	5	5	3	2
229	19	23	30	41	22	41
216	26	21	26	28	26	30
201	12	12	13	10	12	10
188	12	12	13	13	11	12
173	23	21	13	14	17	19
161	21	11	16	11	17	18
159	19	9	11	9	12	14
151	11	9	4	5	3	8
145	18	18	18	16	19	17
135	10	9	9	8	8	13
124	40	24	18	32	5	3
123	22	15	12	22	11	6
122	19	18	19	28	19	21
117	22	16	18	23	18	23
115	18	12	12	17	12	15
96	20	9	11	14	2	2
95	18	7	7	10	12	21
91	17	10	7	9	12	19
85			100	100		
83						100
71		100				
69					100	
57			70	73		
55						70
43	100	57				
41					33	

Tab. 12: Fragmente und relative Intensitäten (%) der isolierten 11,13-Dihydrohelenalinester im Massenspektrum (Basispeak: Acylrest)

m/z \ M^+ (%)	11,13-Dihydrohelenalin- acetat 306 (4)	isobut 334 (4)	isoval 348 (5)	meac 332 (8)	tiglinat 346 (8)
264	13	12	26	5	6
263	7	8	18	15	17
246	60	39	68	59	58
236	8	7	11	4	4
231	73	46	81	53	46
218	6	7	10	12	13
203	5	4	7	7	7
190	6	7	8	8	7
175	9	8	14	14	15
173	16	14	25	19	18
159	9	7	13	11	11
147	13	10	16	14	12
145	13	12	19	16	16
135	13	9	14	16	12
124	30	22	27	8	10
123	20	10	17	12	15
122	25	17	23	22	16
119	6	7	14	16	11
105	7	8	16	16	14
96	8	6	8	3	3
95	24	16	19	20	21
91	13	11	15	17	16
85			100		
83					100
71		100			
69				100	
57			78		
55					50
43	100	60			
41				55	

Die Ursache für diese auffallenden Intensitätsunterschiede liegt darin, daß bei den gesättigten Säuren das α-ständige Säureproton, wie in Abb. 35 formuliert, an das C-4-Carbonyl übertragen wird und sich der Säurerest anschließend zum neutralen Ketenderivat stabilisiert. Die genannten ungesättigten Säuren tragen kein α-ständiges Proton, so daß hier dieser Transfer nicht möglich ist und die Fragmente m/z = 262 bzw. 264 nur in geringer Intensität auftreten. Hier dominieren die durch Abspaltung der jeweiligen Acylreste entstandenen Fragmente m/z = 261 bzw. 263. Aus ihnen erfolgt durch Spaltung der Bindungen C-5/C-6 und C-9/C-10 die Bildung des Spaltprodukts m/z = 122 sowie nach Protonentransfer von C-8 die des Spaltproduktes m/z = 123 (Abb. 35). Der Bildungsweg für das Fragment m/z = 124, wie bei den Estern mit gesättigter Säure, ist hier wegen des fehlenden Protons nicht möglich. Das erklärt die geringe Stärke dieses Bruchstückes im α-Methacrylsäure- und Tiglinsäureester und desgleichen auch die geringe Intensität des sich hieraus ableitenden Bruchstückes m/z = 96 (Abb. 36).

Die genannten Intensitätsunterschiede der Fragmente m/z = 262 und 261 (Helenalinester) bzw. 264 und 263 (Dihydrohelenalinester) sowie der Bruchstücke m/z = 122 und 124 geben somit Hinweise auf die Substitution des α-C-Atoms der Säurekomponenten bei diesen Estern. Sie können deshalb als diagnostisches Kriterium für die Unterscheidung z.B. von Tiglin- und Seneciosäure oder von α-Methacryl- und Crotonsäure im Massenspektrum herangezogen werden. Das

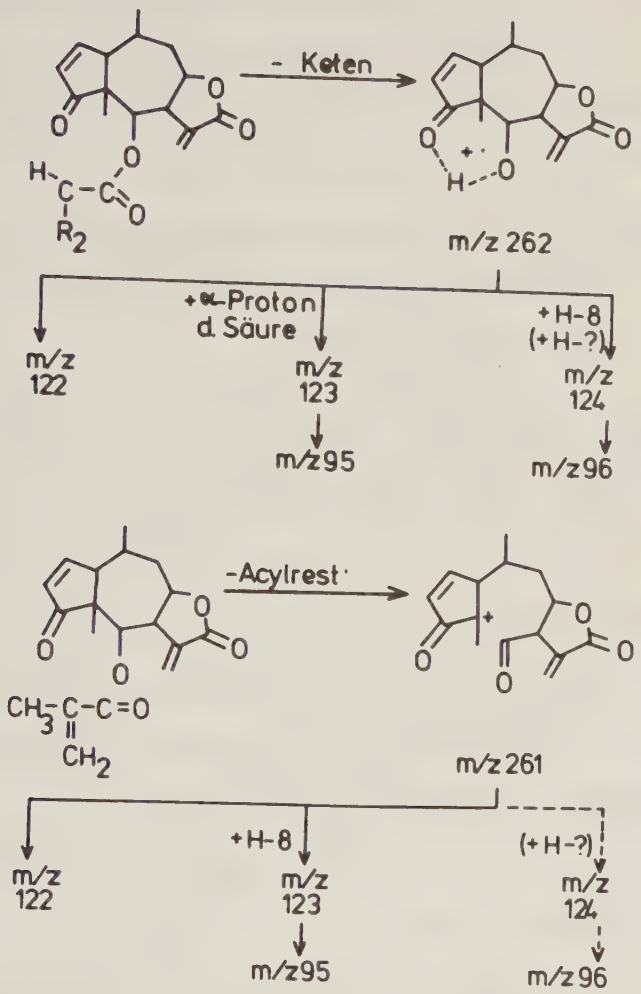


Abb. 36 Entstehung der Fragmente m/z = 261 und 262, m/z = 122, 123 und 124 sowie m/z = 95 und 96 in Helenalinestern mit und ohne α-ständigem Proton in der Säurekomponente (s. auch Abb. 35)

unterschiedliche Fragmentierungsmuster kann darüber hinaus als zusätzlicher Beleg für die Richtigkeit des von TSAI et al. (1969) postulierten Protonentransfers aus der Acetatgruppe im Helenalinessigsäureester angesehen werden.

IV. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester aus den Blüten von A. montana spanischer Herkunft

1. DC - Vergleich verschiedener Herkünfte von Arnikablüten

Eine vergleichende DC - Analyse von A. montana Blüten verschiedener Herkünfte durch WILLUHN u. HERRMANN (1978) führte zu dem Ergebnis, daß sich diese sowohl qualitativ als auch quantitativ in ihrem S1 - Spektrum unterscheiden können. Während bei den drei untersuchten deutschen Herkünften aus dem Schwarzwald und der Rhön und einer aus Jugoslawien stammenden Handelsdroge nur quantitative Unterschiede bei den einzelnen S1 - Komponenten auftraten, zeigten zwei spanische Drogenherkünfte ein davon qualitativ abweichendes Spektrum. In den im Handel befindlichen "Mexikanischen Arnikablüten" konnten schließlich keine S1 nachgewiesen werden.

In der Literatur ist wiederholt auf eine "unechte mexikanische Arnika" hingewiesen worden, ohne daß Angaben über deren Stammpflanze gemacht werden konnten (SCHILCHER, 1965; BECKER, 1971; FROHNE, 1974). Wir konnten zeigen, daß es sich bei diesen mexikanischen "Flores Arnicae" um die

Blütenkörbchen der Asteraceae H e t e r o t h e c a i n u l o i d e s Cass. handelt, die schon seit langem in Mexiko unter dem Namen "Arnica" oder auch "Falsa Arnica" (d.h. falsche Arnica), "Arnica del Pais" (d.h. Arnica des Landes), "Acahual" und "Cuauteteco" dieselbe medizinische Verwendung findet wie Arnica montana in Europa. Derzeit wird die Droge im Tonnenmaßstab auf dem europäischen Drogenmarkt als "Flores Arnicae" angeboten. Die Untersuchungen, die zur Identifizierung der Stammpflanze führten, sowie mikroskopisch-anatomische und chemische Merkmale, anhand deren sich diese Droge von den offizinellen Arnikablüten unterscheiden läßt, sind bereits publiziert (WILLUHN u. RÖTTGER, 1980).

Die von WILLUHN u. HERRMANN (1978) begonnenen Untersuchungen zur Variation der Sl - Führung in A. montana - Blüten verschiedener Herkünfte wurden durch die DC - Analyse von Blüten dreier weiterer, geographisch weit voneinander getrennter, natürlicher Wuchsorte (Arlberg/Tirol; Westerheide/Sylt; Hunsrück) fortgesetzt (s. Abb. 37). Sie zeigten qualitativ dasselbe Sl - Spektrum wie die bereits untersuchten Blüten deutscher und jugoslawischer Provenience, was auf eine große Einheitlichkeit der mitteleuropäischen Arnikaherkünfte hindeutet. Die gegenüber der Handelsdroge spanischer Herkunft auftretenden Unterschiede können nach der erfolgten Identifizierung der Sl - Komponenten dahingehend interpretiert werden, daß die spanischen Blüten kein Helenalin und Helenalinacetat sowie nur geringe Mengen der

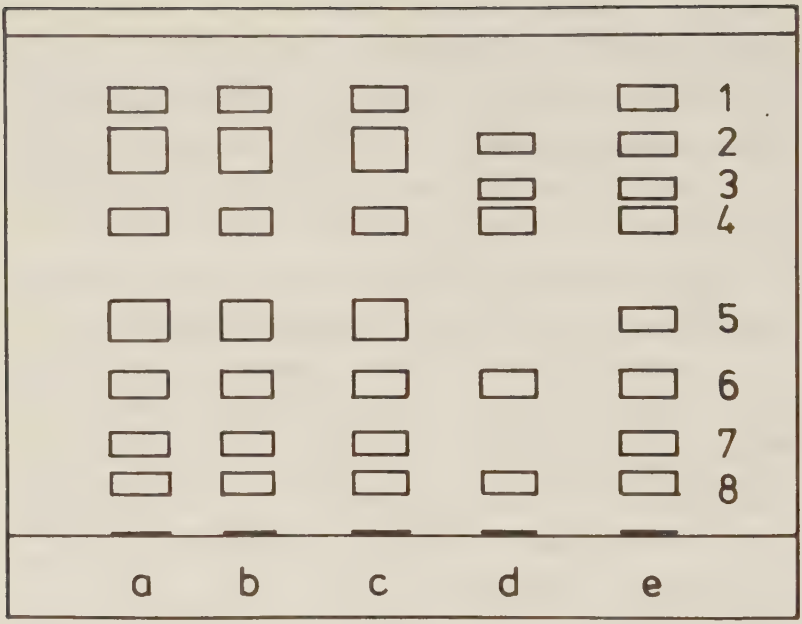
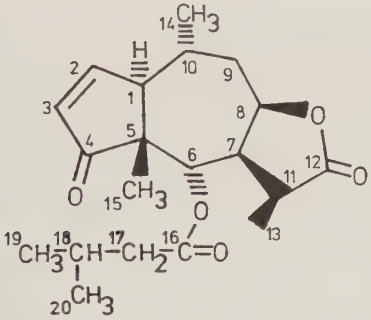


Abb. 37 Schema - Chromatogramm der S1 - Fraktion aus Blüten von A. montana verschiedener Herkünfte

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
Laufmittel: n-Pentan/Ether (32:68)
Detektion: ZIMMERMANN - Reagenz
a: "Gampen/Kapall, Arlberg, Tirol"
b: "Westerheide, Insel Sylt"
c: "Hunsrück"
d: Handelsdroge; Herkunft Spanien (CAELO; Hilden)
e: Vergleichssubstanzen: 1 = Helenalinisovalerianat
2 = Helenalinester
3 = Dihydrohelenalinisoval.
4 = Dihydrohelenalinester
5 = Helenalinacetat
6 = Dihydrohelenalinacetat
7 = Helenalin
8 = Dihydrohelenalin

anderen Helenalinester führen. Hauptkomponenten sind die 11,13-Dihydrohelenalinester (Arnicolide). Bei dem zwischen den Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinestern auftretenden, zusätzlichen S1 der spanischen Blüten könnte es sich aufgrund von Laufhöhe und Färbung mit ZIMMERMANN - Reagenz um Arnicolid B (11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester) handeln, das von POPLAWSKI et al. (1971) aus den Blättern von A. montana isoliert worden ist. Zur Identifizierung dieses in den Blüten der mitteleuropäischen Herkünfte dc nicht nachweisbaren S1 wurde die Verbindung aus der Handelsdroge spanischer Herkunft isoliert.

2. Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester



11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester

Zur Isolierung des nur in den Blüten spanischer Herkunft dc nachweisbaren S1 wurden 1000 g getrocknete und pulverisierte Droge erschöpfend mit Cyclohexan extrahiert. Die weitere Aufarbeitung des Extraktes erfolgte wie auf S. 10 unter "Extrakt A" beschrieben (vgl. auch Abb. 3, S. 12).

Durch SC an Kieselgel mit n-Pentan/Ether (32:68) und nachfolgende SC an Kieselgel mit n-Pentan unter steigendem Zusatz von Ether wurde eine Fraktion erhalten, die im DC nur die Dihydrohelenalinesterzone sowie das sich hiervon nur geringfügig abtrennende neue Sl zeigte. Im GC (Abb. 38) zeigte die Fraktion sechs Komponenten, von denen drei durch direkten GC und GC/MS - Vergleich als die bereits isolierten Isobutter-, α-Methacryl- und Tiglinsäureester des 11,13-Dihydrohelenalins identifiziert wurden (Peak 1, 2 u. 6). Das zusätzlich auftretende Sl (Peak 4) war nach Retentionszeit und MS identisch mit der Vergleichssubstanz Arnicolid B (= 11, 13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester). Die Verbindung zeigte einen Molekülpeak bei M^+ = 348. Den Basispeak bildete der Acylrest mit der Masse m/z = 85, der in Verbindung mit den Fragmenten m/z = 246 und 264 das Vorliegen einer gesättigten C_5-Säure belegte.

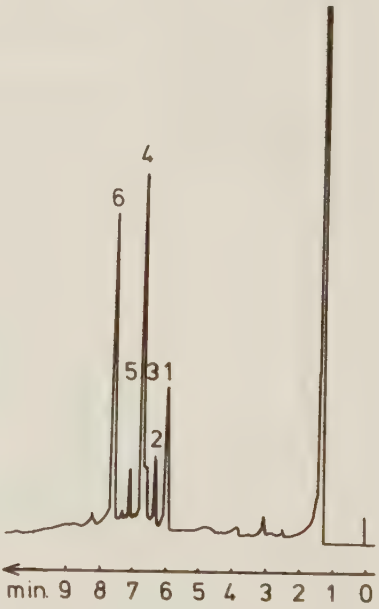


Abb. 38 GC der gereinigten Arnicolidfraktion (System III)

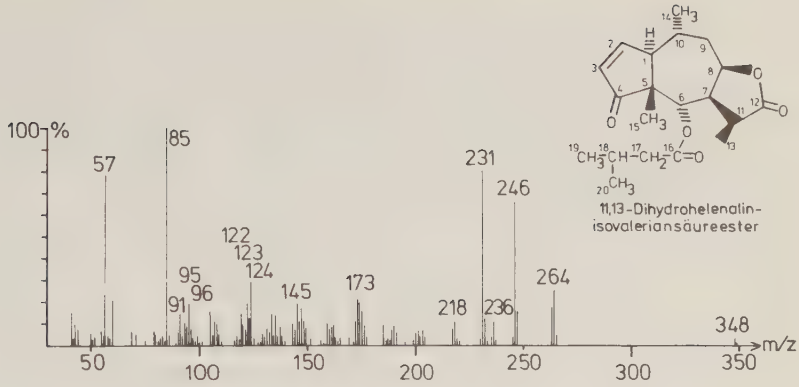


Abb. 39 Massenspektrum von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester

Über präparative HPLC wurden an einer Kieselgelsäule mit n-Hexan/Isopropanol (90:10) als Elutionsmittel 95 mg dieses Esters gc einheitlich isoliert. Die Elementaranalyse ergab in Verbindung mit dem Molekülpeak die Summenformel $C_{20}H_{28}O_5$. Schmelzpunkt, spezifische Drehung und IR - Spektrum (1765 cm^{-1}: CO des γ-Lactonringes; 1710 cm^{-1}: CO des Cyclopentenons; 1733 cm^{-1}: Esterfunktion; 1580 cm^{-1}: $\Delta^{2,3}$-Doppelbindung) stimmten mit den Angaben von POPLAWSKI et al. (1971) für 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester (Arnicolid B) überein (s. Tab. 13 bzw. Abb. 40).

Die Signale des ^{1}H-NMR-Spektrums (Abb. 41) standen mit der Struktur für Arnicolid B in Einklang (Abb. 41 bzw. Tab. 14). Bei 1,51ppm erschien das für 11,13-Dihydrohelenalin typische Dublett für die Methylgruppe an C-11. Da die C-7/C-11 - Bindung wie bei allen bisher bekannten S1 als β-ständig anzu-

Tab. 13: Physikalische Konstanten von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester

	isolierte Verbindung	Literatur[1)]
Molekülpeak, M^+	348	348
CH - Analyse	Gef.: C, 68,89; H, 8,09; O, 23,02 Ber.: C, 68,96; H, 8,05; O, 22,99	
Summenformel	$C_{20}H_{28}O_5$	$C_{20}H_{28}O_5$
UV - Spektrum λ max	228 nm; ϵ = 7497	-
Schmelzpunkt	120,5° - 121,5°C	116° - 117°C
$[\alpha]_D^{20}$	-94° (c=1,9; $CHCl_3$)	-96,7°

1) POPLAWSKI et al. (1971)

nehmen ist, folgt aus der Kopplungskonstante der H-7 und H-8-Protonen, daß der Lactonring 7β,8β- cis verknüpft ist. Die kleine Kopplungskonstante zwischen H-7 und H-6 ($J_{6/7} < 1$) ist typisch für die β-Stellung des Protons an C-6 des in verdrillter Sesselkonformation vorliegenden Siebenringes von 11,13-Dihydrohelenalin (WIEBKE et al., in Vorbereitung; IMAKURA et al., 1980). Die gesättigte C_5-Säure ist somit α-ständig. Das bei 0,88ppm auftretende Dublett für sechs Protonen zeigte, daß es sich bei ihr um die Isovaleriansäure handelte.

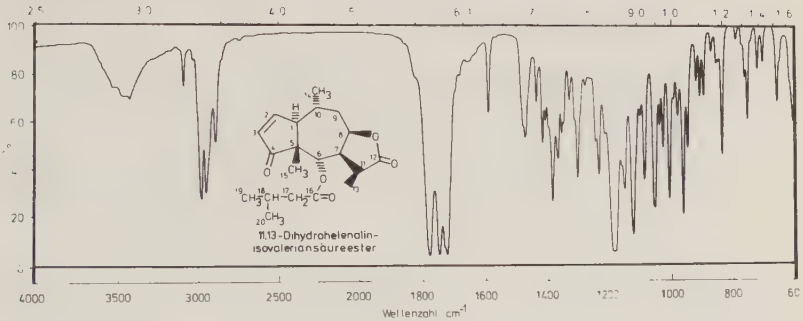


Abb. 40 IR - Spektrum des 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureesters

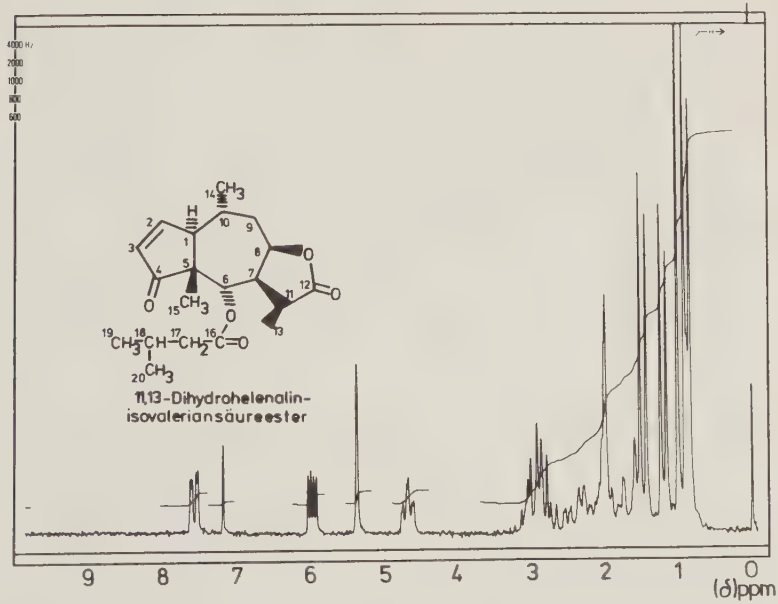


Abb. 41 ^{1}H-NMR-Spektrum des 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureesters

Tab. 14: ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester

[80 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

	isolierte Verbindung			Literaturwerte für 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester[1)]		
Protonen	δ	J	Hz	δ	J	Hz
H - 1	2,99 m	1/2	1,9	3,04 ddd	1/2	1,9
H - 2	7,61 dd	1/3	2,9	7,65 dd	1/3	3,0
H - 3	6,01 dd	1/10	-	6,05 dd	1/10	10,5
H - 6	5,46 br s	2/3	6,0	5,44 s	2/3	6,0
H - 7	2,81 m	6/7	< 1	2,83 dd	6/7	0
H - 8	4,72 ddd	7/11	10,0	4,74 ddd	7/11	10,0
H - 9	2,43 ddd	7/8	6,3	2,47 ddd	7/8	6,5
H - 9'	1,67 ddd	8/9	6,4	1,63 ddd	8/9	6,5
H - 10	-	8/9'	2,0	2,17 m	8/9'	1,5
H - 11	bei 3,03	9/9'	15,0	3,05 m	9/9'	15,0
C_{11} - Me	1,51 d	9/10	2,0	1,51 d	9/10	1-2
C_{10} - Me	1,21 d	9'/10	10,0	1,22 d	9'/10	-
C_5 - Me	1,03 s	10/14	7,0	1,02 s	10/14	6,5
H - 17	bei 2,0	11/13	7,0	-	11/13	7,0
H - 18	-	18/19	7,0	2,41	18/19	6,5
C_{18} - Me	0,89 d	18/20	7,0	0,89 d	18/20	6,5

1) POPLAWSKI et al. (1971)

Damit ist die Struktur des in A. montana - Blüten spanischer Herkunft zusätzlich erscheinenden S1 als 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester bewiesen, der bereits aus den Blättern von A. montana isoliert worden ist (POPLAWSKI et al., 1971). In den Blüten mitteleuropäischer Herkunft ist dieser Ester dc nicht nachweisbar. Ein spurenhaftes Vorkommen auch hier kann aus der gc Analyse der entsprechenden Fraktionen jedoch nicht ausgeschlossen werden (s. Abb. 26, S. 57).

3. Isolierung eines weiteren Sesquiterpenlactons aus den Blütenkörbchen von A. montana spanischer Herkunft

Bei der HPLC - Trennung der Dihydrohelenalinesterfraktion aus den spanischen A. montana - Blüten trennte sich von den bekannten Estern eine weitere, nur in geringer Konzentration auftretende Verbindung ab (Abb. 51, Exp. Teil, S. 145), die gc einheitlich aufgefangen wurde (7 mg). Die viskose Substanz war nicht zur Kristallisation zu bringen. Im GC war sie der im aufsteigenden Ast des Peaks von Dihydrohelenalinisovalerianat liegenden Komponente identisch (Abb. 38, S. 82).

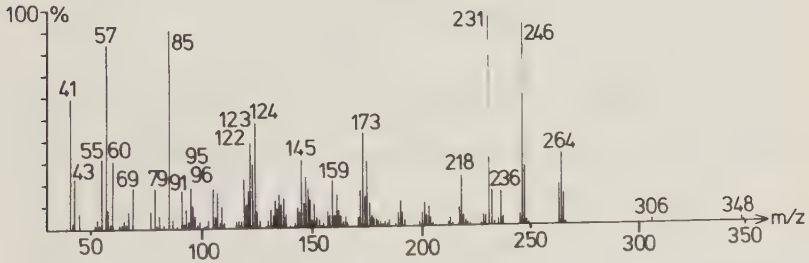


Abb. 42 Massenspektrum des unbekannten Isovaleriansäureesters

Das Massenspektrum (M^+= 348) war praktisch identisch mit dem dieses Esters (vgl. Abb. 39 und Abb. 42), was auf eine hierzu isomere Verbindung hindeutete. Abweichend vom Dihydrohelenalinisovalerianat trat jedoch ein Fragment geringer Intensität bei m/z = 306 (2,5%) auf, das der Abspaltung von Keten aus dem Molekül entspricht (M^+= 42). Dieses Spaltprodukt findet sich bei keinem der bisher bekannten 11,13-Dihydrohelenalinester. In Verbindung mit den Fragmenten m/z = 246 und 264 zeigte der Peak m/z = 85 das Vorliegen einer gesättigten C_5-Säure im Molekül an. Basispeak war das Bruchstück m/z = 231.

Das UV - Spektrum deutete mit seinem Maximum bei 225 nm auf das Vorliegen einer Konjugation hin, die aufgrund der im IR - Spektrum (Abb. 43) erscheinenden Banden bei 1712 cm^{-1} und 1583 cm^{-1} einem cyclischen Keton in Konjugation zu einer Doppelbindung zugeordnet werden kann. Die

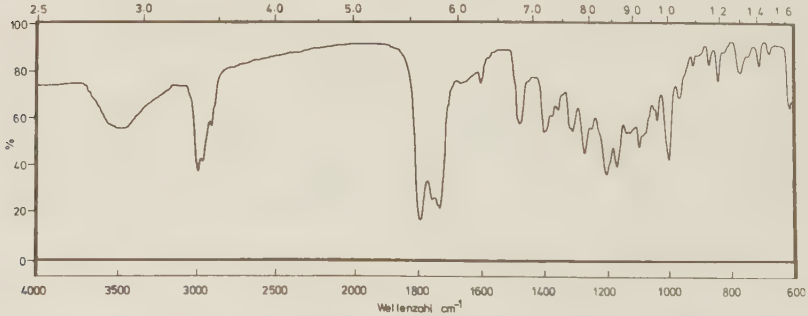


Abb. 43 IR - Spektrum des unbekannten Isovaleriansäureesters

IR - Absorption bei 1772 cm^{-1} zeigte eine γ-Lacton- und bei 1737 cm^{-1} eine Esterfunktion an. Im Fingerprintbereich

waren dagegen deutliche Unterschiede zum Dihydrohelenalin-isovalerianat feststellbar.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 44a und 44b) erschien bei 0,889ppm ein Dublett für sechs Protonen, das bei dieser Lage allgemein für die chemisch äquivalenten Methylgruppen der Isovaleriansäure beobachtet wird. Der zugehörige Kopplungspartner, das Proton an C-3 der Säure, ist, wie Einstrahlungsversuche ergaben, bei 2,0ppm lokalisiert. Aufgrund des ^{1}H-NMR-Spektrums handelt es sich bei der C_5-Säure danach um die Isovaleriansäure. In der Methylgruppenregion zeigte das Spektrum desweiteren ein Singulett bei 1,248ppm für eine tertiäre Methylgruppe und zwei Dubletts bei 1,347ppm (J = 6,8 Hz) und 1,462ppm (J = 6,8 Hz) für zwei sekundäre Methylgruppen. Aufgrund seiner Lage im tieferen Feld sollte die zum letztgenannten Signal gehörige Methylgruppe am γ-Lactonring in Nachbarschaft zur Carbonylfunktion stehen (vgl. Dihydrohelenalinisovaleriansäureester). Das mit dieser Methylgruppe koppelnde Proton erschien als Multiplett bei 2,638ppm. Nach Einstrahlung auf die Methylgruppe vereinfacht sich das Protonensignal zu einem Dublett (J = 13,5 Hz). Das mit der anderen Methylgruppe koppelnde Proton ließ sich nach Einstrahlung bei 1,347ppm im Bereich von 2,1ppm lokalisieren. Das Vorliegen eines α-β-ungesättigten cyclischen Ketons wurde durch die beiden 1H - Signale bei 7,656ppm (dd; J = 1,9 u. 6,0 Hz) und 6,090ppm (dd; J = 2,9 u. 6,0 Hz) angezeigt.

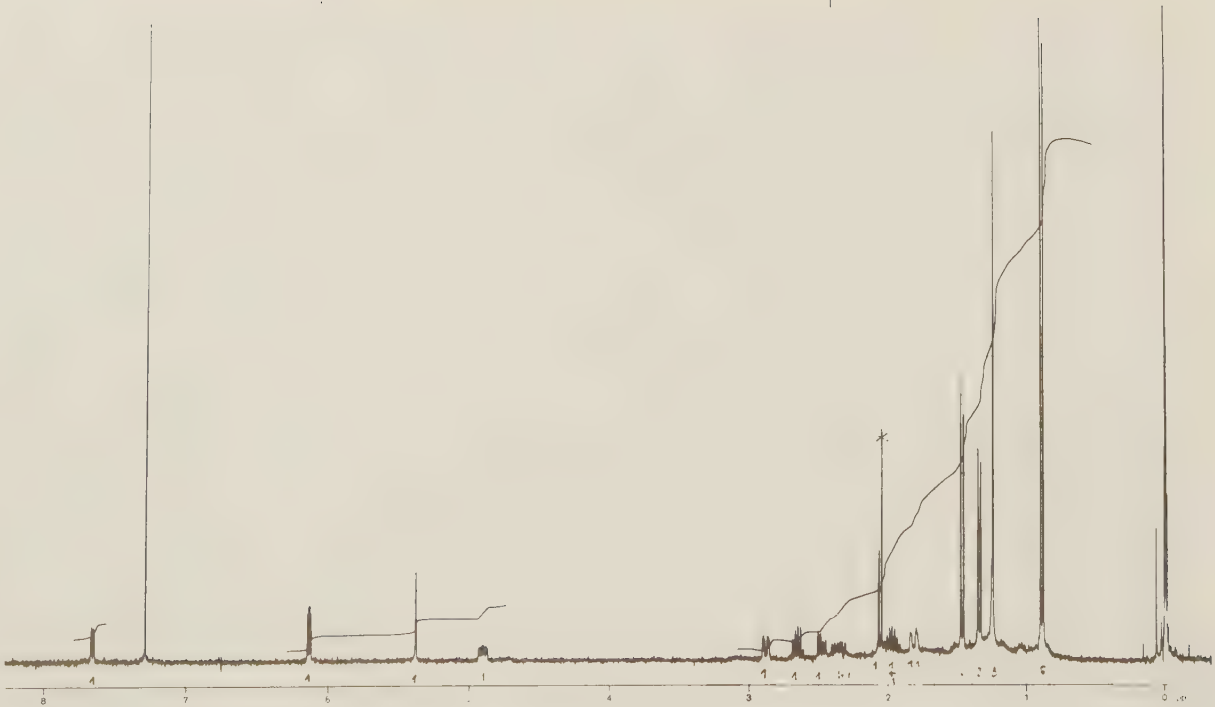


Abb. 44a ^{1}H-NMR-Spektrum des unbekannten Isovaleriansäureesters

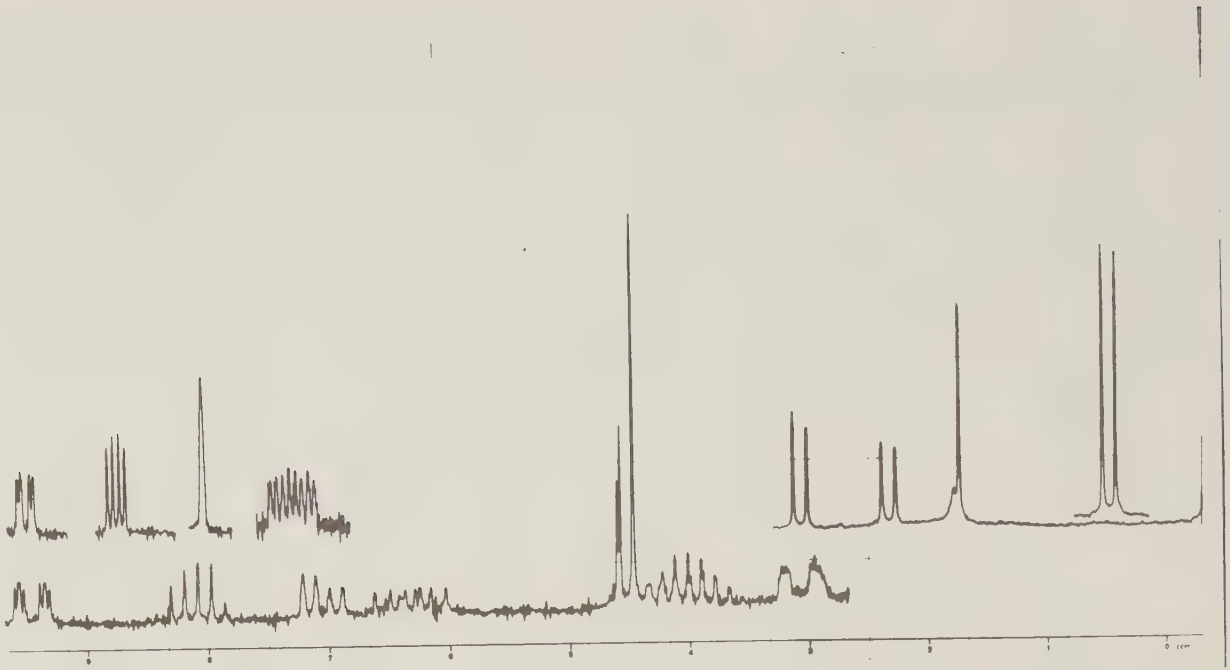


Abb. 44b Gespreiztes ^{1}H-NMR-Spektrum des unbekannten Isovaleriansäureesters

Wie bei den anderen S1 aus Arnikablüten zeigt auch das Spektrum der neuen Verbindung zwei 1H-Signale, deren chemische Verschiebungen mit Protonen korrespondieren, die an sauerstofftragenden C-Atomen gebunden sind. Eines von diesen, bei 5,343ppm, erscheint als breites Singulett und gleicht damit dem H-6β-Proton von Dihydrohelenalinestern, das hier eine gegen 0 Hz gehende Kopplungskonstante mit H-7 aufweist. Diese kleine Kopplungskonstante ist charakteristisch für eine verdrillte Sesselkonformation des Siebenringes bei 7β,8β - cis verknüpften Lactonen der Pseudoguaianolidreihe (Helenanolide), wie sie bei Dihydrohelenalin vorliegt (LEE et al., 1974; MC PHAIL u. ONAN, 1975; WIEBKE et al., in Vorbereitung). Das andere bei 4,871ppm als Multiplett erscheinende Signal sollte dann dem Proton an C-8 zugeordnet werden, das den Sauerstoff des Lactonringes trägt.

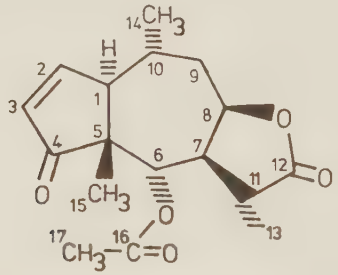
Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigt somit alle Strukturelemente für einen Isovaleriansäureester vom 11,13-Dihydrohelenalintyp, worauf bereits das Massenspektrum hindeutete. In Tab. 15 sind die chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsbilder der ^{1}H-NMR-Signale von Dihydrohelenalinisovalerianat den entsprechenden Signalen des neuen Esters gegenübergestellt, wobei die erfolgte Zuordnung der Protonen mit den durchgeführten Entkopplungsexperimenten in Einklang bleibt. Wie aus diesem Vergleich hervorgeht, treten bei einer Reihe von Signalen z.T. erhebliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen auf. Dies gilt insbesondere für die Signale der Methylgruppen an C-5 und C-10, die im Vergleich zum

Tab.15: Vergleich der ^{1}H-NMR-Verschiebungen (ppm; δ-Skala) und Kopplungskonstanten J (Hz) des unbekannten Isovaleriansäureesters mit denen von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäure-ester und Mexicanin C-acetat [360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

Protonen	Dihydrohelenaliniso-valerianat 1) 3)			unbekannter Iso-valeriansäureester 3)			Mexicanin C-acetat 2) 3)
	δ	J	Hz	δ	J	Hz	δ
H-1	3,04ddd	1/2	1,9	2,866 m	1/2	1,8	–
H-2	7,65dd	1/3	3,0	7,656 dd	1/3	2,9	7,70 dd
H-3	6,05dd	1/10	10,5	6,090 dd	1/10	12,5	6,10 dd
H-6	5,44s	2/3	6,0	5,343 s	2/3	6,0	5,30 s
H-7	2,83dd	6/7	0	2,467 dd	6/7	1	–
H-8	4,74ddd	7/11	10,0	4,871 m	7/11	13,5	4,9 m(ddd)
H-9	2,47ddd	7/8	6,5	2,343 m	7/8	6,1	–
H-9'	1,63ddd	8/9	6,5	1,809m	8/9	12,2	–
H-10	2,17m	8/9'	1,5	bei 2,1	8/9'	2,9	–
H-11	3,05m	9/9'	15,0	2,638 m	9/9'	16,5	–
C_{11}-Me	1,51 d	9/10	1-2	1,462 d	9/10	8,0	1,41 d
C_{10}-Me	1,22 d	9'/10	–	1,347 d	9'/10	1,6	1,32 d
C_5-Me	1,02 s	10/14	6,5	1,248 s	10/10	6,8	1,25 s
		11/13	7,0		11/13	6,8	

1) POPLAWSKI et al. (1971) 2) HERZ et al. (1963), keine weiteren Angaben;
3) Säurekomponenten jeweils unberücksichtigt

11,13-Dihydrohelenalinisovalerianat eine Tieffeldverschiebung von 0,23 bzw. 0,13ppm aufweisen. Eine ähnliche Tieffeldverschiebung (0,13ppm) findet sich auch für das Protonensignal H-8. Eine derartige Verschiebung der genannten Signale tritt auch bei dem Essigsäureester von Mexicanin C auf (s. Tab. 15), bei dem es sich um das 11α-Isomere von 11,13-Dihydrohelenalin handelt, das neben Helenalin von HERZ et al. (1963) aus Helenium mexicanum H.B.K. isoliert worden ist. Aus diesem Grunde und wegen der praktisch identischen Massenspektren lag zunächst die Vermutung nahe, daß es sich bei der isolierten Verbindung um das 11α-Isomere von 11,13-Dihydrohelenalinisovalerianat handeln könnte, obwohl bei diesem Isomeren keine Keten-



Mexicanin C acetat

abspaltung aus dem Grundmolekül auftreten sollte. Ein Vergleich der Kopplungskonstanten zwischen H-7 und H-11 sowie der Aufspaltungsmuster des H-8-Signals zeigte jedoch, daß es sich bei der isolierten Verbindung nicht um das 11α-Isomere handeln konnte.

Die Kopplungskonstante zwischen den Protonen H-7 und H-11 beträgt bei 11,13-Dihydrohelenalin und seinen Estern (11ß-Methyl) ca. 10 Hz. Bei Annahme einer 11α-ständigen Methylgruppe kann keine Kopplungskonstante von 13,5 Hz resultieren, wie sie bei der isolierten Verbindung in dem Signal für das mit der Methylgruppe am Lactonring koppelnde Proton zu finden ist. Das Dreidingmodell zeigt, daß die Kopplungskonstante im Falle einer α-Stellung der Methylgruppe an C-11 kleiner als 10 Hz sein muß.

Bei 11,13-Dihydrohelenalin und seinen Estern erscheint das Signal für H-8 stets als typisches Triplett, das weiter aufspalten kann (vgl. u.a. Abb. 41, S. 85 u. Abb. 33, S. 64 sowie HERZ et al., 1963; IMAKURA et al., 1980). Es resultiert aus den etwa gleich großen Kopplungen mit H-7 und H-9 (J = ~ 6 Hz) und einer kleineren Kopplung von ca. 2 Hz mit H-9'. Bei der isolierten Verbindung zeigt dieses Signal dagegen ein Multiplett aus acht jeweils ca. 3 Hz voneinander entfernten Linien. Ein derartiges Aufspaltungsbild ist beim Vorliegen von drei Kopplungspartnern nur erklärbar, wenn die entsprechenden Kopplungskonstanten etwa 3 Hz, 6 Hz und 12 Hz betragen. Die zu fordernde Konstante von ca. 6 Hz ist mit demjenigen Proton gegeben, in dessen Signal (2,467ppm) sich auch die große Kopplung von 13,5 Hz zu H-11 (2,638ppm; Kopplungspartner der Methylgruppe am Lactonring) wiederfindet.

Alle anderen möglichen Stereoisomeren von 11,13-Dihydrohelenalinisovalerianat müssen aufgrund der ^{1}H-NMR-Daten ebenfalls ausgeschlossen werden. Die 5β-Methylgruppe und die 7β-Orientierung des Lactonringes müssen aus biosynthetischen Gründen als gegeben angesehen werden und liegen so in allen bisher bekannten Pseudoguaianoliden vor. Eine cis - Verknüpfung des Fünf- und Siebenringes, d.h. eine β-Stellung des Protons an C-1, führt im Dreidingmodell zu keiner Konfiguration, die den gefundenen Kopplungskonstanten gerecht wird. Ein 7β,8α-trans-Lactonring ist abzulehnen, da in diesem Falle $^3J_{7/8}$ kleiner als 6 Hz sein müßte und darüber hinaus nicht eine Tieffeldverschiebung, sondern eine Hochfeldverschiebung des H-8-Signals im Vergleich zum entsprechenden Signal bei 11,13-Dihydrohelenalinen auftreten sollte (vgl. YOSHIOKA et al., 1973).

Ein 7β,6-verknüpfter Lactonring (Ambrosanolide) ist auszuschließen, weil hierbei im Dreidingmodell weder für eine 7β,6β-cis- noch für eine 7β,6α-trans-Verknüpfung ein Winkel von annähernd 90^o zwischen den Protonen an C-6 und C-7 einstellbar ist, der wegen der Kopplungskonstante von ca. 0 Hz zu fordern wäre. Damit ist aus den Daten des ^{1}H-NMR-Spektrums eine Pseudoguaianolidstruktur für die isolierte Verbindung mit Sicherheit auszuschließen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Sesquiterpenlactone vom Eudesmanolidtyp (vgl. Abb. 2, S. 8) im ^{1}H-NMR-Spektrum große Ähnlichkeiten mit Pseudoguaianoliden aufweisen, was

in der Vergangenheit zu Fehlinterpretationen geführt hat (YOSHIOKA et al., 1970). Versuche, die gefundenen Strukturmerkmale und ^{1}H-NMR-Daten mit einer Eudesmanolidstruktur in Einklang zu bringen, führten zu keinem Ergebnis. Dieses gelingt nur unter Postulierung eines anomal verknüpften Grundgerüstes, wie dies bei Sesquiterpenen verschiedentlich gefunden worden ist (BOHLMANN et al., 1976). In Abbildung 45

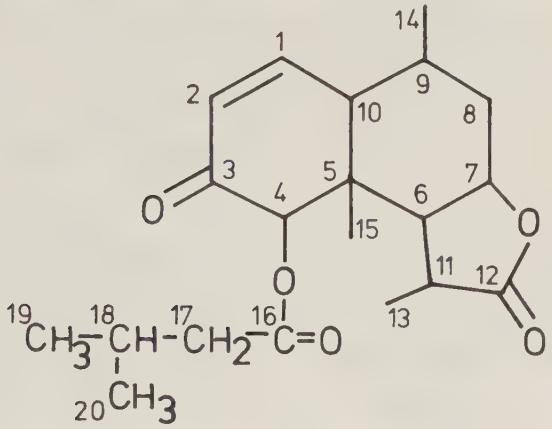


Abb. 45 Mit den spektroskopischen Daten in Einklang stehende hypothetische Struktur des isolierten Sesquiterpenlactonisovaleriansäureesters

ist die Struktur eines Grundgerüstes wiedergegeben, mit der die im ^{1}H-NMR-Spektrum auftretenden chemischen Verschiebungen, Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten in Einklang stehen. In Tabelle 16 sind die ^{1}H-NMR-Daten der isolierten Verbindung dieser Struktur zugeordnet. In diesem Falle muß das Proton an C-4 als Singulett erscheinen (5,343ppm),

Tab. 16: ^{1}H-NMR-Verschiebungen des unbekannten Isovaleriansäureesters unter Zugrundelegung der hypothetischen Struktur (s. Abb. 45)
[360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multiplett]

Protonen	δ	J	Hz
H - 1	7,656 dd	1/2	6,0
H - 2	6,090 dd	1/10	1,8
H - 4	5,343 br s	2/10	2,9
H-- 6	2,467 dd	6/7	6,1
H - 7	4,871 m	6/11	13,5
H - 8	2,34 m	7/8	~ 12,2
H - 8'	1,809 ddd	7/8'	~ 2,9
H - 9	bei 2,1	8/8'	16,5
H - 10	2,866 ddd	8/9	~ 8,0
H - 11	2,638 m	8'/9	~ 1,6
C_{11} - Me	1,462 d	9/10	12,5
C_9 - Me	1,347 d	9/14	6,8
C_5 - Me	1,248 s	11/13	6,8
H - 17	bei 2 u. 2,2		
H - 18	bei 2,1	18/19	7,0
C_{18} - Me	0,889 d	18/20	7,0

dessen Verbreiterung aus einer Fernkopplung zu H-6 resultieren könnte (Dreidingmodell). Allerdings sollte wegen der Nachbarschaft zu zwei Sauerstoffatomen dieses Signal in etwas tieferem Feld erscheinen. Ähnliche Fernkopplungen lassen sich aus dem Modell auch zwischen H-7 und H-9 ableiten, was die leichte Aufspaltung der acht Linien im Signal bei 4,871ppm erklären würde. Gleiches würde auch für die Linienverbreiterung der Signale für H-10 und H-8 zutreffen. Alle anderen bereits diskutierten ^{1}H-NMR-Daten lassen sich aus dem Dreidingmodell ebenfalls mit dieser Struktur in Einklang bringen.

Das Fragmentierungsmuster der Verbindung im Massenspektrum läßt sich jedoch mit dieser Struktur nicht erklären. Die endgültige Struktur und Klärung muß deshalb durch weitere Analysen nach Isolierung größerer Substanzmengen erfolgen.

D. Untersuchungen zur Wirkung der Sesquiterpenlactone aus Arnica montana L.

1. Bestimmung der LD_{50} der Sesquiterpenlactonfraktion aus Arnikablüten

Obwohl A. montana nicht zu den ausgesprochenen Giftpflanzen zählt, wird in der Literatur über schwerwiegende Vergiftungen mit zum Teil tödlichem Ausgang berichtet (TURK, 1853; SCHELENZ, 1938; GEßNER u. ORZECHOWSKI, 1974), die vorallem den Magen - Darm - Trakt (Erbrechen und Durchfall), aber auch das Herz- und Kreislaufsystem betreffen. Noch vor kurzem hat die Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker vor der unkontrollierten Einnahme von Arnikazubereitungen (wässerige oder alkoholische Auszüge) gewarnt, nachdem sich Personen nach täglicher Einnahme von zwei Tassen Arnikatee mit Intoxikationen in ärztliche Behandlung begeben mußten (132/81; Pharmaz. Ztg. 126, 2022, 1981).

Über die Toxizität von Sesquiterpenlactonen und sesquiterpenlactonführender Pflanzen ist wiederholt berichtet worden (CLARK, 1936; SPERRY et al., 1964; IVIE et al., 1975 a, b; RODRIGUEZ et al., 1976; WITZEL et al., 1976). Nach der Identifizierung der Sesquiterpenlactone lag es nahe, bei ihnen das bisher unbekannte toxische Prinzip der Arnikablüten zu suchen. Deswegen und zur Abschätzung der Toxizität wurde die LD_{50} einer gereinigten S1 - Gesamtfraktion der Arnikablüten (s. Exp. Teil, S. 159) an

männlichen Mäusen (Stamm NMRI-Hannover) nach intraperitonealer und auch nach oraler Applikation bestimmt.

Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungszeit wurde den Tieren die in Sonnenblumenöl gelöste S1 - Fraktion i.p. und mit einer Schlundsonde oral appliziert. Pro Dosis wurden jeweils zehn Tiere herangezogen und über einen Zeitraum von vierzehn Tagen beobachtet. In den Tabellen 17 und 18 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Danach beträgt die LD_{50} der S1 - gesamtfraktion nach i.p. Applikation 31 mg/kg Maus und 123 mg/kg Maus nach oraler Gabe.

Tab. 17: Akute Toxizität der Sesquiterpenlacton - Gesamtfraktion nach i.p. Applikation

Anzahl der Mäuse pro Dosis: 10; Berechnung der LD_{50} nach LITCHFIELD u. WILCOXON (1949); LD_{50} = 31,0 (26,3 - 35,6) mg/kg Maus; S = 1,31 (1,14 - 1,51)

Dosis mg/kg Maus	Tot nach Tagen post Applikation								
	1	2	3	4	5	6	7	8	14
18,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27,6	0	0	0	0	1	1	1	2	0
36,0	0	0	0	0	3	2	1	1	0
39,8	0	0	0	0	2	3	3	1	0
43,4	0	0	0	2	4	2	2	-	-
52,8	5	2	1	2	-	-	-	-	-
63,3	5	3	1	1	-	-	-	-	-

Im Beobachtungszeitraum zeigten die Tiere symptomatische Veränderungen, die von der Art der Applikation unabhängig waren.

Tab. 18: Akute Toxizität der Sesquiterpenlacton - Gesamtfraktion nach oraler Applikation

Anzahl der Mäuse pro Dosis: 10; Berechnung der LD_{50} nach LITCHFIELD u. WILCOXON (1949);
LD_{50} = 123,0 (108,0 - 136,0) mg/kg Maus;
S = 1,20 (1,07 - 1,35)

Dosis mg/kg Maus	Tot nach Tagen post Applikation							
	5	6	7	8	9	10	11	14
110	0	0	0	0	1	1	1	0
132	0	0	0	1	4	0	2	0
158	0	1	1	2	2	2	1	0
190	0	1	1	0	3	3	1	0

Etwa 1 - 2 Stunden nach der Verabreichung des Testextraktes trat vorübergehend eine leichte Erhöhung der Atmungsfrequenz ein. Die Tiere zeigten einen aufgekrümmten Rücken und wirkten sediert. Nach 12 Stunden post applicationem konnten bei den Tieren für einen Zeitraum von 3 - 4 Tagen keine besonderen Symptome beobachtet werden. Ungefähr 8 - 10 Stunden vor Todeseintritt waren die Mäuse stark sediert und zeigten eine flache, verlangsamte Atmung (finale Schnappatmung). Die Tiere verendeten im Koma, nachdem zuvor Koordinationsstörungen an den hinteren Extremitäten zu beobachten waren. Bei der anschließenden Sektion

konnten ausgeprägte ödematöse Areale in der Lunge festgestellt werden; die übrigen Organe waren makroskopisch ohne besonderen Befund. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, daß die Sesquiterpenlactone der Arnikablüten das toxische Prinzip bei den beschriebenen Vergiftungsfällen mit Arnikazubereitungen darstellen (SCHOENEMANN, 1938; SCHELENZ, 1938; MENGE, 1953).

2. Beeinflussung der Hexobarbitalschlafzeit durch die Sesquiterpenlactongesamtfraktion*

Die Hexobarbitalschlafzeit wird benutzt, um den enzymatischen Metabolismus in der Leber in Zusammenhang mit einer biologischen Reaktion zu untersuchen. Dabei ist die Dauer des durch Barbiturat bedingten Schlafes umgekehrt proportional zur Intensität des Lebermetabolismus des Barbiturates. Untersuchungen mit Sesquiterpenen haben MALKINSON u. SHERE (1979) durchgeführt und dabei eine Verkürzung der Schlafdauer gefunden. Für die Sesquiterpenlactone vom Helenanolidtyp liegen bisher keine Untersuchungen hierüber vor.

Einem Kollektiv von zehn männlichen Mäusen (Stamm NMRI-Hannover) wurde die gereinigte in Sonnenblumenöl gelöste Sl - Gesamtfraktion in einer Dosierung von jeweils 5 mg/kg Maus

---

*Herrn Dr. Abel, Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die Durchführung der Tierversuche zur Toxizitäts- und Schlafzeitbestimmung sowie für seine Hilfe bei der Auswertung dieser Versuche.

an vier aufeinander folgenden Tagen i.p. verabreicht. Am fünften Tag wurde den Mäusen 80 mg/kg Hexobarbital i.p. injiziert und die Schlafdauer der Tiere bestimmt. Parallel dazu wurde als Kontrolle ein Kollektiv von zehn Tieren beobachtet, denen nur die entsprechende Menge Barbiturat und zuvor ein gleiches Volumen an Sonnenblumenöl injiziert worden war. In Abbildung 46 ist das Ergebnis dieser Untersuchung wiedergegeben.

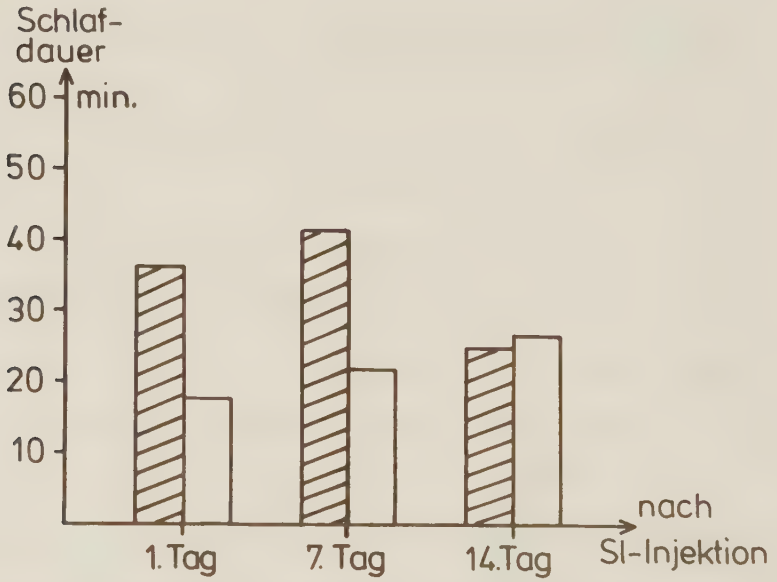


Abb. 46 Hexobarbitalschlafzeit unter dem Einfluß eines i.p. applizierten Sesquiterpenlacton - Gesamtextraktes aus Arnikablüten.

(SI - Injektion: 5 mg/kg Maus, i.p. 4 Tage lang; Hexobarbital: 80 mg/kg Maus am 1., 7. u. 14. Tag nach Abschluß der SI - Injektion, i.p.)

= Kollektiv ohne SI - Extrakt (10 Mäuse)

= Kollektiv mit SI - Extrakt (10 Mäuse)

Die mit S1 - Extrakt behandelten Tiere zeigten eine signifikante Verlängerung der Hexobarbitalschlafzeit (36,4 Min. ± 5,9 Min.) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (17,7 Min. ± 2,6 Min.). Nach sieben Tagen wurde die Bestimmung wiederholt. Dabei war bei den mit Sesquiterpenlactonen behandelten Tieren noch eine deutliche Verlängerung der Hexobarbitalnarkose (41,0 Min. ± 9,2 Min.) gegenüber dem Kontrollkollektiv (21,6 Min. ± 4,8 Min.) zu beobachten. Zwei Wochen nach der ersten Bestimmung traten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kollektiven mehr auf (Extraktgruppe: 24,5 Min. ± 9,2 Min.; Kontrollgruppe: 26,6 Min. ± 7,9 Min.).

3. Die Wirkung von Helenalinacetat auf die Herztätigkeit

3.1. Die Wirkung von Helenalinacetat auf den spontan schlagenden rechten Vorhof

Eine Beeinflussung der Herztätigkeit durch Arnikazubereitungen wird in der Literatur wiederholt beschrieben (u.a. STUHLFAUTH, 1938; THIES, 1943; FABER, 1953). Die Injektion eines Arnikafluidextraktes bei Hunden führte nach anfänglicher Steigerung der Herztätigkeit zu einem Rückgang der Organarbeit bis zum völligen Stillstand (PEREIRA, 1929). An Katzen bewirkten alkoholische Blütenauszüge ebenfalls Herzstillstand (FORST, 1943). LIST u. FRIEBEL (1974) konnten in kombinierten Atmungs- und Kreislaufversuchen am Kaninchen für Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinacetat eine kurzzeitige Blutdrucksenkung und für Helenalinacetat eine

schädigende Wirkung auf das Herz nachweisen. HERRMANN (1978) hat für das Xanthanolid Carabron aus Arnica longifolia einen positiv inotropen Effekt am isolierten Meerschweinchenvorhof gemessen.

Zwei männliche Meerschweinchen mit einem Gewicht von 508 g und 600 g wurden durch Genickschlag getötet. Das Herz wurde nach dem Entbluten dem Thorax entnommen, der Vorhof abgetrennt und in ein mit KREBS-HENSELEIT-Lösung gefülltes und mit Carbogen durchperltes Organbad eingebracht.* Nach Anbringen eines Dehnungsmeßstreifens an das isolierte Organ wurden die Kontraktionsamplituden über einen Direktschreiber registriert. Die Wirkstoffzugabe erfolgte erst nach Erreichen einer konstanten Kontraktionsamplitude und Schlagfrequenz (ca. 20 Min. nach Einhängen des Vorhofs). Die Schlagfrequenz wurde durch Anschluß einer Pulsfrequenzmeßeinheit bzw. auch durch Auszählen der Einzelkontraktionen gegen die Zeit gemessen.

In das 50 ml Organbad wurde jeweils soviel in 60%igem Ethanol gelöstes Helenalinacetat gegeben, daß hier eine $5x10^{-6}$, $1x10^{-5}$, $2x10^{-5}$, $4x10^{-5}$, $6x10^{-5}$ und $8x10^{-5}$ molare Badendkonzentration erreicht wurde. Die Zugabe der Substanz

---

*Herrn Prof. Dr. Greeff, Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die Überlassung der Meßplätze und Frau Brühne für die Durchführung der Präparation der Vorhöfe.

erfolgte kumulativ jeweils nach Einstellung eines stabilen Kontraktionsplateaus am selben Organ. In Abbildung 47 ist der Einfluß von Helenalinacetat auf den spontan schlagenden rechten Vorhof wiedergegeben.

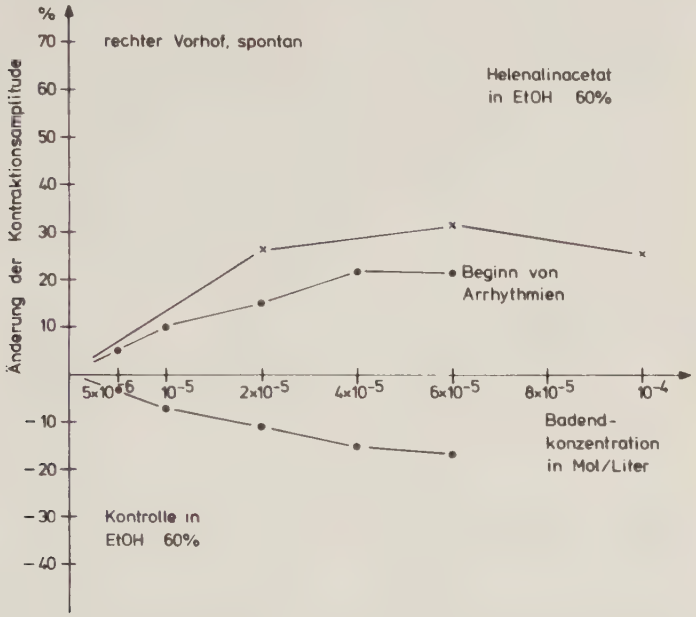


Abb. 47 Positiv inotroper Effekt von Helenalinacetat auf den spontan schlagenden rechten Meerschweinchenvorhof

—x—x— = 1. Vorhof (Meerschweinchen 508 g)

—•—•— = 2. Vorhof (Meerschweinchen 600 g)

Der in einem Kontrollversuch ermittelte negativ inotrope Effekt des Lösungsmittels Ethanol (60%ig) ist in der Abbildung angegeben. Etwa 5 Minuten nach Zugabe der Helenalinacetatlösung (5×10^{-6} molare Badendkonzentration) wurde

eine deutlich positive Beeinflussung der Kontraktionsstärke registriert, die ihr Maximum nach 15 - 20 Min. erreichte. Eine Steigerung der Helenalinacetatkonzentration auf $2x10^{-5}$ Mol/l führte zu einer erneuten Verstärkung der Kontraktionsamplitude, die unter Berücksichtigung der Alkoholwirkung 25% bzw. 36% über dem Ausgangswert lag. Bei einer Konzentration von $6x10^{-5}$ Mol/l wurde eine Erhöhung der Kontraktionskraft von 31% bzw. 42% über dem Ausgangswert erreicht. Eine weitere Wirkstoffzugabe führte zu keiner Steigerung des positiv inotropen Effekts. Ein Vorhof zeigte bei dieser Dosierung bereits Arrhythmien und kam schließlich zum Stillstand. Beim anderen Vorhof traten die Organschädigungen erst nach weiterer Dosissteigerung auf. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Vorhöfe ca. 60-70 Min. dem Einfluß von Helenalinacetat ausgesetzt.

An beiden Vorhöfen konnte kein signifikanter negativ chronotroper Effekt beobachtet werden. Die Schlagfrequenz lag beim ersten Vorhof während des gesamten Zeitraums bei ca. 75 Schlägen/Min., beim zweiten bei ca. 60 Schlägen/Min. Eine Ökonomisierung der Herztätigkeit im Sinne einer Herzglykosidwirkung trat unter dem Einfluß von Helenalinacetat somit nicht auf.

3.2. Die Wirkung von Helenalinacetat auf den elektrisch gereizten linken Vorhof

In der ersten Versuchsreihe hatten sich am spontan schlagenden rechten Vorhof Organschädigungen in Form von Arrhythmien

bemerkbar gemacht. Daher wurde in einer zweiten Versuchsanordnung mit elektrisch gereizten linken Vorhöfen gearbeitet, um während des Beobachtungszeitraumes eine konstante Frequenz aufrecht erhalten zu können.

Nach der Präparation des Herzens wurden die linken Vorhöfe auf eine Platin/Iridium - Elektrode aufgebunden, in das Organbad gebracht und mit einer Frequenz von 1 Hz (60 Schläge/Min.) mittels eines Reizgebers angeregt. Sie wurden denselben Helenalinacetat - Konzentrationen ausge-

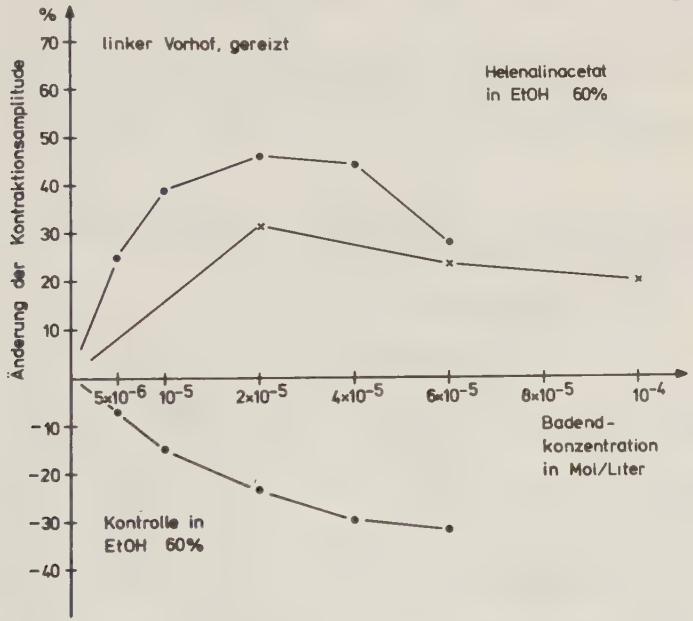


Abb. 48 Positiv inotroper Effekt von Helenalinacetat auf den elektrisch gereizten linken Meerschweinchenvorhof

—x—x— = 1. Vorhof (Meerschweinchen 508 g)

—•—•— = 2. Vorhof (Meerschweinchen 600 g)

setzt, wie sie am spontan schlagenden rechten Vorhof getestet worden waren. In Abbildung 48 ist die Wirkung am Herzen bei dieser Versuchsanordnung wiedergegeben. Auch hier wurde ein positiv inotroper Effekt auf das Organ registriert, der unter Berücksichtigung der negativ inotropen Wirkung des Lösungsmittels bei einer Badendkonzentration von $2x10^{-5}$ Mol/l zu einer Kontraktionsamplitudensteigerung von 37% bzw. 48% im Vergleich zur Ausgangsamplitude des Vorhofs führte. Höhere Helenalinacetatdosen führten zu keiner weiteren Kontraktionskraftzunahme. Vielmehr ist nach dieser Zeit, in der die Vorhöfe ca. 60 - 70 Min. der Helenalinacetateinwirkung ausgesetzt waren, eine geringe Abnahme der Kontraktionsstärke zu registrieren.

4. Untersuchung der Herzwirkung von Helenalinacetat an der isolierten Muskelfaser*

Eine Methode zur Ermittlung der ED_{50} einer Substanz, die sich direkt auf die therapeutisch genutzte, positiv inotrope Wirkung bezieht, ist die Messung einer solchen Wirkung am isolierten, intakten Papillarmuskel des Meerschweinchens oder der Katze durch Aufnahme der isometrischen, dosisabhängigen Kontraktionskurven. Hierbei wird durch die stufenweise Erhöhung der Wirkstoffkonzentration die maximale

---

*Herrn Prof. Dr. M. Reiter, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität, München, danke ich sehr für die Durchführung der Untersuchung.

Spannungsentwicklung (inotrope Wirkung) ermittelt. Man erhält hieraus die Dosis - Wirkungskurve und damit die halbe maximale inotrope Wirkung (ED_{50} in Mol/l), wenn man die Zunahme der Kontraktionskraft in % der maximalen Kraftzunahme zur molaren Wirkstoffkonzentration in Relation setzt. Außerdem läßt sich am isolierten Papillarmuskel auch der zeitliche Verlauf der inotropen Wirkung und damit die durch eine Serum - Eiweißbindung unbeeinflußte Wirkungsgeschwindigkeit ermitteln.

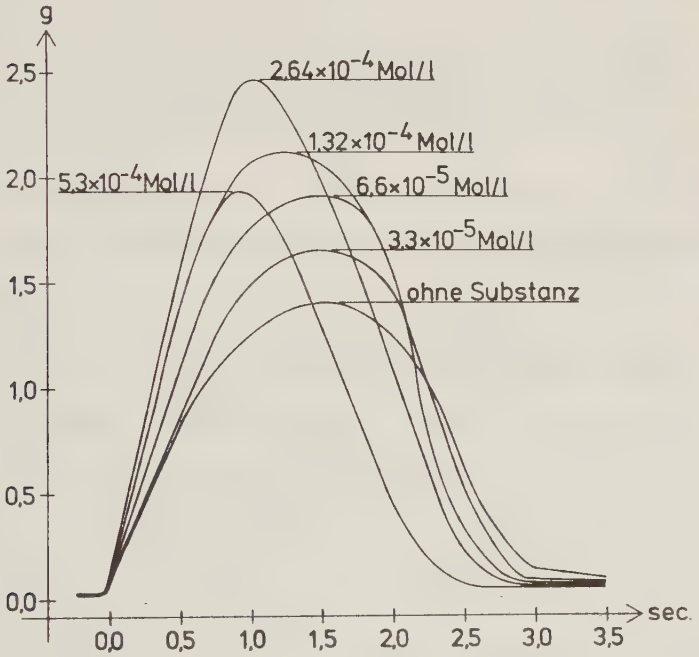


Abb. 49 Wirkung von Helenalinacetat auf den isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens

Mit dieser Methode wurde das aus Arnikablüten isolierte Helenalinacetat auf seine Herzwirksamkeit getestet. Abbildung 49 zeigt die isometrischen Spannungskurven der Substanz am Meerschweinchen - Papillarmuskel. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige positive Inotropie mit einer ED_{50} von $5x10^{-5}$ Mol/l. Die maximale Spannungsentwicklung war bei einer $2,64x10^{-4}$ molaren Helenalinacetatkonzentration erreicht. Eine weitere Dosissteigerung führte auch in diesem Modell zu einer Abnahme der inotropen Wirkung.

5. Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat*

Arnikablüten werden äußerlich als Antiseptikum und Wunddesinfiziens verwendet. Die antibiotische Wirkung natürlich vorkommender, ungesättigter Lactone von einfacher chemischer Struktur wie α- und β-Angelicalacton, Patulin, Protoanemonin und α-Methylbutyrolacton ist in der Literatur wiederholt beschrieben worden (HAYNES, 1948; CAVALLITO u. HASKELL, 1946; MITSCHER, 1975). Auch von verschiedenen Sesquiterpenlactonen ist eine antibakterielle Aktivität bekannt

---

*Herrn Dr. W. Quack, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Interpretation der Ergebnisse.

(CAVALLITO u. HASKELL, 1946; MITSCHER, 1975; LEE et al., 1977b). Helenalin wirkt antibiotisch gegen die humanpathogenen Pilze Trichophyton gypseum, Trichophyton acuminatum und Epidermophyton (OLECHNOWICZ et al., 1963). LEE et al. (1977b) haben eine antimikrobielle Wirkung von Helenalin und Dihydrohelenalin auf die gram-positiven Bakterien Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis nachgewiesen. Bereits aus diesen vorliegenden Befunden geht hervor, daß die Sesquiterpenlactone der Arnikablüten an der ihnen nachgesagten antiseptischen Wirkung beteiligt sind. Im Folgenden sollen das antimikrobielle Wirkungsspektrum von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat weiter untersucht sowie die minimale Hemmkonzentration (MHK) gegen Bakterien bestimmt werden.

Die getesteten Stämme und deren Kulturbedingungen sind im Exp. Teil, S. 162 angegeben. In einem orientierenden Screening mit dem Plattendiffusionstest traten bei einer Konzentration von 10 µg bzw. 100 µg pro Filterpapierrondelle (Ø 6 mm) Hemmhöfe zwischen 10 mm und 30 mm in Kulturen von Bacillus brevis, Bacillus subtilis und Streptomyces viridochromogenes auf. Zur Bestimmung der Wirkungsintensität der drei Helenanolide gegen Bakterien wurde die MHK im Reihenverdünnungstest bestimmt. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt.

Die MHK für Helenalin und Helenalinacetat lag bei allen getesteten gram-positiven Bakterien und bei Streptomyces

Tab. 19: Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Helenalin (H), Helenalinacetat (HA) und 11,13-Dihydrohelenalinacetat (DHA) aus Arnikablüten

Bakterien	MHK (µg/ml)		
	H	HA	DHA
Pseudomonales			
Pseudomonas fluorescens	>100	>100	>100
Xanthomonas oryzae	>100	>100	>100
Eubacteriales, gram-neg.			
Escherichia coli	>100	>100	>100
Proteus vulgaris	10 - 20	50 - 70	10 - 100
Eubacteriales, gram-pos.			
Arthrobacter citreus	50 - 70	50 - 70	>100
Bacillus brevis	10 - 20	10 - 20	50 - 70
Bacillus subtilis	50 - 70	20 - 50	>100
Corynebact. insidiosum	20 - 50	20 - 50	50 - 100
Micrococcus roseus	7 - 10	7 - 10	20 - 50
Mycobacterium phlei	20 - 50	20 - 50	50 - 70
Sarcina lutea	50 - 70	50 - 70	70 - 100
Staphylococcus aureus	50 - 70	50 - 70	>100
Actinomycetales			
Streptomyces viridochromog.	20 - 50	20 - 50	50 - 70

viridochromogenes unterhalb von 100 µg/ml. Von den beiden gram-negativen Bakterien wurde nur das Wachstum von Proteus vulgaris innerhalb dieser Konzentration vollständig gehemmt,

während die MHK von E. coli und der beiden Pseudomonales oberhalb von 100 µg/ml lag. Eine höhere Helenanolidkonzentration konnte wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge nicht getestet werden.

Außer gegen Proteus vulgaris und Bacillus subtilis hatten Helenalin und sein Acetat gleiche Wirkungsintensität. 11,13-Dihydrohelenalinacetat zeigte dagegen durchgehend eine geringere Wirkung als Helenalinacetat. Daraus geht hervor, daß neben der β-unsubstituierten Cyclopentenonstruktur auch die Exomethylengruppe am γ-Lactonring, wenn auch in geringerem Ausmaß, an der antibakteriellen Wirkung beteiligt ist.

Von den untersuchten Pilzen zeigte sich nur Botrytis cinerea, der Erdbeergrauschimmel, im Plattendiffusionstest gegen die Helenanolide sensibel. Alle übrigen getesteten Pilze wurden bei einer Konzentration von 100 µg/Filterpapierrondelle nicht gehemmt. In Tabelle 20 sind die Hemmhofdurchmesser bei verschiedenen Helenanolidkonzentrationen wiedergegeben. Wie daraus hervorgeht, ist die Wirkungsintensität des Essigsäureesters gegen Botrytis cinerea bedeutend größer als die des freien Helenalins. Es fällt auf, daß 11,13-Dihydrohelenalinacetat hier aktiver als Helenalin ist. Diese Korrelation wurde bei den getesteten Bakterienstämmen in keinem Falle gefunden. Es ist deshalb zu vermuten, daß die Acetylgruppe für die Penetration in die eukaryotische Zelle des Botrytis cinerea eine größere Bedeutung hat als

Tab. 20: Antibiotische Wirkung von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat gegen Botrytis cinerea im Plattendiffusionstest

Substanz	Hemmhofdurchmesser (mm) bei 1 µg Helenanolid/Filterpapierscheibe	10 µg Helenanolid/Filterpapierscheibe	100 µg Helenanolid/Filterpapierscheibe
Helenalin	0	0	12
Helenalinacetat	0	10	24
11,13-Dihydro-helenalinacetat	0	0	18

für die Penetration in eine prokaryotische Zelle. Die Durchdringung der Zellwand und Membranstruktur wäre hier somit entscheidender für eine antibiotische Wirkung als ein zusätzliches, nucleophil angreifbares Zentrum am Lactonring. Ein ähnliches Phänomen wurde von QUACK (1978) bei dem Sesquiterpendialdehyd Merulidial und seinem Acetat beobachtet. Auch hier zeigte das Acetylderivat gegen den Testpilz Pythium debaryanum eine größere antibiotische Aktivität als der freie Alkohol.

E. Diskussion der Ergebnisse

Trotz intensiver chemischer Analyse der von Arnica montana L. stammenden offizinellen Arnikablüten herrscht bis heute Unklarheit über die Inhaltsstoffe, die für die empirischen und in zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen festgestellten Wirkungen verantwortlich sind (s. Einleitung). Nachdem in den letzten Jahren Sesquiterpenlactone vom Pseudoguaianolidtyp in der Gattung Arnica nachgewiesen wurden, bahnt sich in dieser ungeklärten Wirkstoffrage ein Wandel an, da einige Vertreter dieser Stoffgruppe als biologisch und pharmakologisch recht aktive Verbindungen bekannt sind. Es lag daher nahe, in den Blütenkörbchen von Arnica montana nach Verbindungen dieser Stoffklasse zu suchen. LIST u. FRIEBEL (1974) konnten erstmals Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat isolieren. HERRMANN et al. (1978) identifizierten anschließend den Helenalinmethacrylsäureester. DC - Analysen von WILLUHN u. HERRMANN (1979) zeigten, daß neben diesen drei Verbindungen noch mindestens fünf weitere Sesquiterpenlactone in den Arnikablüten vorhanden sind. Die vorliegenden Untersuchungen zur Sesquiterpenlactonführung der Blütendroge führten neben den genannten drei Verbindungen zur Isolierung und Identifizierung von zwölf weiteren Pseudoguaianoliden. Es sind dieses Helenalin (1) und dessen Isovaleriansäure- (2), Isobuttersäure- (3), 2-Methylbuttersäure- (4) und Tiglinsäureester (5), 11,13-Dihydrohelenalin (6) und dessen Isovaleriansäure- (7), Isobuttersäure- (8),

α-Methacrylsäure- (9) und Tiglinsäureester (10) sowie der Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester (11) und der 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester (12). Darüber hinaus wurde der Isovaleriansäureester eines weiteren Sesquiterpenlactons isoliert, dessen Struktur wegen der zu geringen Menge jedoch nicht aufgeklärt werden konnte. Die spektroskopischen Daten zeigen, daß er nicht zur Gruppe der Pseudoguaianolide oder Xanthanolide (Secoguaianolide) gehört, wie die bisher bekannten Sesquiterpenlactone der Gattung Arnica. Da über die Einordnung der Gattung Arnica in die Triben der großen Familie der Asteraceae keine Einigkeit besteht (HEROUT, 1971; BOHLMANN u. ZDERO, 1973), und sich die Sesquiterpenlactone für taxonomische Probleme auf der Ebene der Gattungen und Triben dieser Familie als nützliche Merkmalsquelle erwiesen haben (u. a. HEGENAUER, 1964; HEROUT, 1966a,b, 1971; STELLINK u. SPITZNER, 1966; HERZ, 1968, 1973; HEROUT u. SORM, 1969; RODRIGUEZ et al., 1971), ist eine Nachisolierung und Strukturaufklärung dieser Verbindung anzustreben.

Bei sechs der zwölf für Arnikablüten neuen Verbindungen handelt es sich um erstmals in der Natur gefundene Sesquiterpenlactone (Verbindungen 2 - 5 und 11, 12). Die 11,13-Dihydrohelenalinester sind mit Ausnahme des Tiglinsäureesters bereits in den Blättern von A. montana gefunden und als Arnicolide bezeichnet worden (POPLAWSKI et al., 1971). Dieser neue Ester konnte jedoch von uns durch GC/MS - Analyse als Verunreinigung in dem aus den Blättern isolierten

Arnicolid B identifiziert werden, sodaß er ebenfalls Inhaltsstoff der Blätter ist. Ein dc Vergleich der Blütenkörbchen und Blätter zeigte, daß sich beide Organe in der Sl - Führung unterscheiden. Die Blätter enthalten lediglich 11,13-Dihydrohelenalin und dessen genannte Ester, während die Blüten zusätzlich Helenalin und Helenalinester führen (s. Abb. 4, S. 17). Aufgrund dieser unterschiedlichen Inhaltsstofführung sind Unterschiede in der Wirkung der Flores Arnicae und der gelegentlich noch verwendeten Folia Arnicae (LIST u. HÖRHAMMER, 1972) zu erwarten.

Die DC - Analyse von Arnikablüten verschiedener natürlicher Wuchsorte zeigte, daß die mitteleuropäischen Herkünfte ein weitgehend einheitliches Sl - Komponentenspektrum aufweisen. Die von WILLUHN u. HERRMANN (1978) gefundene, davon abweichende Sl - Führung spanischer Arnikablüten konnte dahingehend aufgeklärt werden, daß diese als zusätzliches Sl 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester (Arnicolid B) enthalten, das im DC der mitteleuropäischen Arnikablüten nicht auftritt. Desweiteren führen die spanischen Blüten kein Helenalin und Helenalinacetat sowie vergleichsweise geringe Mengen an Helenalinestern. Sie ähneln damit in ihrem Sl - Spektrum mehr den Blättern (vgl. Abb. 4, S. 17 u. Abb. 37, S. 80). Auch hier ist deshalb mit Wirkungsunterschieden bei den im Handel befindlichen Blüten dieser verschiedenen Herkünfte zu rechnen. Das von EVSTRATOVA et al. (1969) aus A. foliosa isolierte und auch in den Blüten und Blättern von A. montana nachgewiesene Pseudoguaianolid Arnifolin

(s. Abb. 1, S. 5) wurde in den von uns aufgearbeiteten mitteleuropäischen und spanischen Arnikablüten nicht gefunden. Damit zeigen die bisherigen Untersuchungen, daß bei Arnikablüten unterschiedlicher Herkünfte mit einer chemischen Variation in der Sl - Führung gerechnet werden muß, was bei dieser Stoffgruppe bereits für andere Asteraceen - Arten bekannt ist (KONDO et al., 1977).

Die identifizierten Sl lassen sich aus der Droge sowohl mit Wasser als auch mit lipophilen Lösungsmitteln extrahieren (s. Abb. 3, S. 12). Sie konnten demzufolge dc in verschiedenen Arnikazubereitungen nachgewiesen werden (z.B. Teeaufguß; Arnikatinktur; Arnicorin^{R}, Chemie Homburg; Arnica - Kneipp - Salbe^{R}; Arnicaöl, einem oft verwendeten Drogenauszug mit Sonnenblumenöl). Nach Abschätzung der präparativen Ausbeuten ist mit einem ungefähren Sl - Gehalt von 0,3% - 0,4% in den Blütenkörbchen zu rechnen.

Als Nebenerscheinung bei der äußerlichen Anwendung der "Arnicae Flos", besonders in Form der Tinktur, wurde in einer Reihe von Fällen das Auftreten von allergenen Kontaktdermatitiden beobachtet (s. Zusammenfassung von HAUSEN, 1980). Seit etwa zehn Jahren ist bekannt, daß Sesquiterpenlactone mit einer exocyclischen Methylengruppe am γ-Lactonring ein hohes Sensibilisierungsvermögen haben (u.a. MITCHELL, 1975; SCHULZ et al., 1975; EVENS u. SCHMIDT, 1980). Diese als Haptene anzusehenden Sl werden über die Exomethylengruppe nach Art einer MICHAEL-Reaktion

an SH-Gruppen tragende Proteine angelagert und kommen so als Vollantigen zur Wirkung. HERRMANN et al. (1978) und HAUSEN et al. (1978) haben zeigen können, daß Helenalin und sein Acetat die sensibilisierenden Allergene der Arnikablüten sind. Da die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Helenalinester und auch der 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester dieses wesentliche immunologische Strukturelement ebenfalls besitzen, müssen auch diese Verbindungen als Sensibilisatoren angesehen werden.

Zahlreiche Sesquiterpenlactone haben wegen ihrer antitumoralen Wirkung großes Interesse erlangt (u.a. HARTWELL u. ABBOTT, 1969). Eine notwendige, wenn auch nicht in allen Fällen ausreichende strukturelle Voraussetzung für diese Wirkung (s. HERRMANN, 1978 u. KIM, 1980) ist das Vorhandensein einer Exomethylengruppe am γ-Lactonring. Dieses Strukturelement ist, wie bereits ausgeführt, einem nucleophilen Angriff zugänglich. Derartige Sesquiterpenlactone haben sich als Alkylantien erwiesen, die selektiv an nucleophile Gruppen, vorallem SH-Gruppen von Enzymen, über eine Art MICHAEL-Reaktion angelagert werden können (u.a. JONES u. YOUNG, 1968; KUPCHAN et al., 1971, 1975; DUPUIS et al., 1974; WATSON et al., 1975; LEE et al., 1977c; HALL et al., 1977; PICMAN et al., 1978). Sesquiterpenalctone, die daneben noch eine weitere nucleophil angreifbare Doppelbindung besitzen, wie etwa Helenalin im Cyclopentenonring, sind im allgemeinen wesentlich wirksamer und toxischer als monofunktionelle Verbindungen. Von den in Arnikablüten identi-

fizierten S1 ist die antitumorale Wirkung von Helenalin, Helenalinacetat und synthetisch hergestelltem Helenalinisobutyrat und -tiglinat sowie von 11,13-Dihydrohelenalin in verschiedenen in vivo und in vitro Tumormodellen nachgewiesen worden (u.a. LEE et al., 1972, 1973, 1981; PETTIT et al., 1973, 1974). Das Acetat und Isobutyrat zeigten dabei im Vergleich zum freien Helenalin eine etwas geringere, das Tiglinat jedoch eine bedeutend stärkere Wirkung. Helenalin war erwartungsgemäß wirksamer als 11,13-Dihydrohelenalin oder auch 2,3-Dihydrohelenalin. Die Reduktion beider nucleophiler Zentren im Molekül führte zum vollständigen Wirkungsverlust (LEE et al., 1981). Beide Alkylierungszentren spielen somit eine entscheidende Rolle bei der antitumoralen Wirkung des Helenalins. In vielen Modellen ist darüber hinaus gezeigt worden, daß für diese Wirkung cytotoxische Effekte verantwortlich sind, die sich aus der selektiven Alkylierung von SH-Gruppen tragenden Enzymen ergeben, durch die die Zellteilung reguliert wird (HALL et al., 1977, 1978, 1980 und dort zitierte Literatur). Für Helenalin wurde u.a. von LEE et al. (1977a,c) an mit Ehrlich - Ascites - Tumor infizierten Mäusen die Hemmung der DNA- und Proteinsynthese sowie mehrerer SH-Gruppen tragender Enzyme nachgewiesen (u.a. Phosphofructokinase, Hexokinase, HMG - CoA - Reductase). Wohl über die Hemmung der Phosphodiesterase erfolgte ein Anstieg des intrazellulären cAMP - Spiegels um 300%. Dieser Effekt wird mit einer Reduktion der Zellproliferation und einer Steigerung der

Zelldifferenzierung in Zusammenhang gebracht (POSTERNAK, 1974; GULLINO u. CHO-CHUNG, 1974). Eine Erhöhung des cAMP - Spiegels bei Mäusen durch Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalingaben (2,5 mg - 5 mg/kg Maus i.p.) sowie eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung (ATP - Synthese) wurde auch von HALL et al. (1978) nachgewiesen.

Diese Cytotoxizität von Sesquiterpenlactonen mit der Enon - Gruppierung $H_2C = C - C = O$ (entweder in Form eines β-unsubstituierten Cyclopentenons oder eines α-Methylen-γ-Lactonringes), die auf der Alkylierung und damit auf der Hemmung von Schlüsselenzymen des zellulären Stoffwechsels beruht, erklärt auch ihre antimikrobielle Aktivität. Die Sl dürften deshalb die wesentlichen Verbindungen für die bekannte antiseptische Wirkung der Arnikablüten sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die antibiotische Wirkung von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat gegen gram-positive Bakterien, gegen den gram-negativen Keim Proteus vulgaris sowie gegen Streptomyces viridochromogenes und den Pilz Botrytis cinerea nachgewiesen (s. Tab. 19, S. 114 bzw. Tab. 20, S. 116). Die minimale Hemmkonzentration lag bei den getesteten Bakterien durchgehend unterhalb von 100 µg/ml. Auch 11,13-Dihydrohelenalinacetat war in diesem Konzentrationsbereich wirksam, wobei die MHK - Werte hier jedoch jeweils geringfügig höher lagen. Die Untersuchungen bestätigen somit die Ergebnisse von LEE et al. (1977b), daß für die antimikrobielle Wirkung der β-unsubsti-

tuierte Cyclopentenonring das wesentliche Strukturmerkmal ist. Anders als bei den Untersuchungen dieser Autoren zeigt sich jedoch, daß auch die Exomethylengruppe am γ-Lactonring, wenn auch in untergeordnetem Maße, an der Wirkung der Verbindungen beteiligt ist. Auch die Aussage, die Helenanolide seien ausschließlich gegen gram-positive Bakterien wirksam, muß durch den Nachweis der Hemmwirkung auf Proteus vulgaris eingeschränkt werden.

Die Erfolge bei der äußerlichen Anwendung der Arnikatinktur als Wundantiseptikum und bakteriostatisches Mittel lassen sich somit durch die Helenalinderivate der Droge erklären, da örtlich hierbei die wirksamen Konzentrationen selbst bei Anwendung der verdünnten Tinktur erreicht werden. Aus den Untersuchungen von LEE et al. (1977b) geht darüber hinaus hervor, daß die Veresterung von Helenalin mit ungesättigten Säuren zu einer Steigerung der antibiotischen Aktivität führt.

Die bereits von OLECHNOWICZ u. STEPIEN (1963) für Helenalin nachgewiesene antifungische Wirkung konnte auch für Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat an Botrytis cinerea festgestellt werden. Hier wird die antibiotische Wirkung von Helenalin durch die Veresterung mit Essigsäure verstärkt, und auch 11,13-Dihydrohelenalinacetat erweist sich als wirksamer als Helenalin (s. Tab. 20, S. 116). Die Ursache hierfür dürfte in der besseren Penetration der lipophilen Ester in die Pilzzelle zu suchen sein (s. QUACK, 1978).

Mit dem Nachweis der cytotoxischen Helenanolide in Arnikablüten ist gleichzeitig das bisher unbekannte toxische Prinzip der Droge gefunden, das für die wiederholt beschriebenen Vergiftungsfälle nach oraler Verwendung von Arnikablüten verantwortlich ist. Über Vergiftungserscheinungen beim Weidevieh durch Helenalin berichten SPERRY et al. (1964). Von WITZEL et al. (1976) wurden die LD_{50}-Werte für Helenalin nach oraler Applikation an Mäusen (150 mg/kg), Ratten (125 mg/kg), Schafen (100 - 125 mg/kg), Kaninchen (90 mg/kg) und Hamstern (85 mg/kg) ermittelt. Die Werte zeigen, daß verschiedene Säugetierspecies unterschiedlich reagieren, wobei die Maus unter den getesteten Tieren am unempfindlichsten ist. Von KIM (1980) wurde die LD_{50} für Helenalin nach i.p. Applikation an Mäusen mit 9,86 mg/kg bestimmt. Ein Vergleich mit dem Wert nach oraler Verabreichung zeigt, daß Helenalin oral relativ schlecht resorbiert wird (Toxizitätsverhältnis i.p./oral = 15:1).

In Arnikablüten liegen Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin vorwiegend verestert vor, was aufgrund der dadurch veränderten Lipophilie zu einer besseren Resorption und damit zu anderen LD_{50}-Werten führen kann. Aus diesem Grunde wurde die akute Toxizität einer gereinigten S1 - Gesamtfraktion aus Arnikablüten österreichischer Herkunft nach oraler und i.p.Applikation an Mäusen bestimmt (s. Tab. 17, S. 101 u. Tab. 18, S. 102). Die Werte lagen oral niedriger (123 mg/kg) und i.p. höher (31 mg/kg) als die für Helenalin mitgeteilten Angaben. Insgesamt ergibt sich bei den veresterten Helenano-

liden eine bessere orale Resorption im Vergleich zum freien Helenalin (Toxizitätsverhältnis i.p./oral = 4:1). Die gegenüber Helenalin geringere Toxizität der S1 - Fraktion nach i.p. Applikation resultiert daraus, daß in dieser Fraktion ein hoher Anteil an 11,13-Dihydrohelenalinestern vorliegt, die nur ein alkylierendes Zentrum haben und deshalb weniger toxisch sind als Helenalin und seine Ester (u.a. LEE et al., 1972, 1981; KUPCHAN et al., 1971). Desweiteren war die getestete S1 - Fraktion nicht frei von anderen Begleitstoffen, sodaß der tatsächliche LD_{50}-Wert für die Gesamt - Sesquiterpenlactone niedriger liegt.

Die bei den Versuchstieren beobachteten Vergiftungssymptome (Erhöhung der Atmungsfrequenz, Krämpfe, Atemstörungen, Kollaps) entsprechen denen, die für Arnikaintoxikationen angegeben werden (GEßNER u. ORZECHOWSKI, 1974). Die Sektion der toten Tiere zeigte ausgeprägte ödematöse Bereiche in der Lunge, die von einer Schädigung des Herzens hervorgerufen sein könnten.

Die Bestimmung der Barbituratschlafzeit an Mäusen nach i.p. Verabreichung der S1 - Fraktion aus österreichischen Arnikablüten (5 mg/kg/Tag, vier Tage lang) ergab, daß die Tiere unter der Einwirkung der Helenanolide etwa doppelt so lange wie ein Vergleichskollektiv schliefen (s. Abb. 46, S. 104). Als Erklärung hierfür darf angenommen werden, daß die für den Abbau des Hexobarbitals in der Leber verantwortlichen Enzyme (COOPER u. BRODIE, 1955) durch die Helenanolide ge-

hemmt werden (Alkylierung der SH-Gruppen). Eine signifikante Verlängerung der Barbituratschlafzeit war auch noch nach einer Woche zu beobachten und trat erst nach einer weiteren Woche nicht mehr auf (s. Abb. 46, S. 104). Dies deutet auf eine lange Verweildauer der Helenanolide im Organismus hin bzw. auf eine langanhaltende Dauer der von ihnen hervorgerufenen Effekte.

Übereinstimmend wird in vielen älteren pharmakologischen Untersuchungen über eine Beeinflussung von Herz, Kreislauf und Atmung durch die Arnikablüten berichtet. Hierüber hat FABER (1953) zusammenfassend referiert. Auch beim Menschen wurden nach Einnahme größerer Extraktmengen Pulsbeschleunigung, Herzklopfen und Atemnot beobachtet (SCHULZ, 1929; SCHOENEMANN, 1938; PEYER, 1927). Arnikablüten gelten so als Herztonikum und leichtes Analeptikum, ohne daß über die Natur der dafür verantwortlichen Wirkstoffe Klarheit herrscht. Durch den Nachweis der Helenanolide in der Droge ist auch hierfür das stoffliche Prinzip gefunden. Bereits LAMSON (1913) hat eine Wirkung von Helenalin auf das Frosch- und Kaninchenherz nachgewiesen. Bei Fröschen führte die Applikation von 3 mg Helenalin in den dorsalen Lymphsack zu einer anfänglichen Verbesserung der Herzarbeit in der Diastole. Danach wurde jedoch die Systole schwächer und nach 5 - 6 Stunden starben die Tiere an einer Herzmuskelparalyse. Bei Kaninchen führten 8 mg Helenalin/kg i.v. appliziert zum Tod durch Herzstillstand in der Systole. Die Perfusion eines Kaninchenherzens mit 60 mg Helenalin in 300 ml

Lösung nach der LANGENDORFF-Methode führte zunächst für die Dauer von 20 Min. zu einer größeren und langsameren Kontraktion des Herzmuskels, d.h. Helenalin zeigte hier eine positiv inotrope und negativ chronotrope Wirkung. Nach dieser Zeit nahm die Systole jedoch ab und die Schlagfrequenz zu. Es kam zu Herzarrhythmien und schließlich 24 Min. nach Perfusionsbeginn zum Herzstillstand. LIST u. FRIEBEL (1974) fanden nach i.v. Applikation von Helenalinacetat bei Kaninchen eine kurzfristige Blutdrucksenkung auf annähernd die Hälfte des Ausgangswertes und eine Verringerung der Pulsfrequenz. Im Dosisbereich von 5 mg Helenalinacetat/kg Kaninchen konnten sie bereits eine schädigende Wirkung auf das Herz feststellen, nicht jedoch bei 11,13-Dihydrohelenalinacetat. Bei Schafen war die toxische Wirkung von Tenulin (IVIE et al., 1975) von hämorrhagischen Verletzungen des Herzens begleitet. Das Pseudoguaianolid Parthenin reduziert bei Hunden und Katzen die Herzfrequenz und die Kontraktionsamplitude (SETH u. BHATIA, 1978). HERRMANN (1978) fand für Carabron am isolierten Meerschweinchenvorhof eine positiv inotrope Wirkung.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von Helenalinacetat am spontan schlagenden rechten und am elektrisch gereizten linken Meerschweinchenvorhof sowie am isolierten Papillarmuskel getestet. In beiden Modellen zeigte die Substanz eine dosisabhängige positive Inotropie (s. Abb. 47 u. 48, S. 107 u. 109 bzw. Abb. 49, S. 111), wobei 10^{-6} bis 10^{-4} molare Lösungen eingesetzt wurden. Wie am

LANGENDORFF-Herz kam es jedoch in diesen beiden Modellen bei einer längeren Helenalinacetat - Einwirkung im Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-4} molaren Lösungen zu einer Abschwächung der Kontraktionsamplitude sowie zu Arrhythmien und Extrasystolen, die deutlich eine schädigende Wirkung anzeigten.

Als mögliche Erklärung für diese Herzwirkung kann daran gedacht werden, daß eine anfängliche positive Inotropie durch Hemmung der Phosphodiesterase und einem daraus resultierenden Anstieg von cAMP vermittelt wird. Eine Zunahme der cAMP - Konzentration durch Helenalin ist in verschiedenen in-vivo-Untersuchungen nachgewiesen worden (u.a. LEE et al., 1977a; HALL et al., 1980). Am Herzen soll nach neueren Untersuchungen das cAMP über eine Phosphorylierung der Troponine die Calciumwirkung beeinflussen (PERRY, 1975). Bei hohem cAMP - Gehalt der Zelle ist die Calcium-induzierte Inaktivierung des Erschlaffungsfaktors Troponin und damit die Kontraktibilität der Myofibrillen verstärkt. Auch Coffein und Theophyllin steigern den cAMP - Gehalt und dadurch die Inotropie des Herzens über eine direkte Hemmung der Phosphodiesterase (MITZNEGG, 1975).

Die anschließend auftretende, schädigende Herzwirkung (Kontraktionsabnahme, Arrhythmien, Herzstillstand) könnten durch Hemmung der oxydativen Phosphorylierungsprozesse verursacht werden, wie sie ebenfalls wiederholt für Helenanolide nachgewiesen worden sind (LEE et al., 1977a; HALL et al.,

1980). Hierdurch wird die ATP - Synthese gehemmt und die für die Herzarbeit notwendige Energie nicht nachgeliefert. Die vorliegenden Ergebnisse über die Wirkung der alkylierenden Pseudoguaianolide auf das Herz lassen keinen Zweifel zu, daß es sich bei diesen Verbindungen um den in der Literatur beschriebenen "toxischen Herzstoff" (FORST, 1943) handelt.

Auch die bekannte atemanaleptische Wirkung der Arnikablüten ist auf die Helenanolide in der Droge zurückzuführen. Bereits LAMSON (1913) hat diese Wirkung für Helenalin beschrieben. LIST u. FRIEBEL (1974) konnten am Kaninchen eine Steigerung der Atemfrequenz und -tiefe bereits nach i.v. Applikation von 0,3 mg Helenalin- bzw. 11,13-Dihydrohelenalinacetat pro kg Körpergewicht nachweisen. Bei Ratten induzierte eine Dosis von 0,45 mg Helenalin/kg eine 35%-ige Atemfrequenzzunahme bei gleichzeitiger Verstärkung der Atemtiefe um 43% (HERRMANN, 1978). Das lipophilere Helenalinacetat zeigte dieselbe Wirkung bereits bei einer Dosierung von 0,25 mg/kg Ratte.

Eine der markantesten Wirkungen der Arnikablüten ist die antiphlogistische Wirkung. Auch hier hat man in den letzten Jahren zeigen können, daß Sesquiterpenlactone mit nucleophil angreifbaren Doppelbindungen entzündungshemmend wirken (HALL et al., 1979). Von allen bisher in den Entzündungsmodellen, Carragheenan-Rattenpfötchen-Ödem und Adjuvans-Arthritis, getesteten Verbindungen erwies sich das bifunktionelle Helenalin am wirksamsten und wesentlich wirksamer als

die mitgetesteten synthetischen Antiphlogistica Indometacin und Phenylbutazon. Im Krümmreflex - Test, der allgemein zum Nachweis einer analgetischen Wirkung bei Entzündungsschmerzen herangezogen wird, war Helenalin ebenfalls wirksamer als die genannten synthetischen Verbindungen. Aus den Untersuchungen ging hervor, daß der Exomethylengruppe am 7β,8β-cisoiden γ-Lactonring für die starke antiphlogistische Wirkung die größte Bedeutung zukommt. Im Vergleich zu Helenalin (72%) zeigte 2,3-Dihydrohelenalin nur 50% und 11,13-Dihydrohelenalin nur 12% Oedemhemmung, während Tetrahydrohelenalin wirkungslos war.

In anschließenden Untersuchungen konnten die Autoren zeigen (HALL et al., 1980), daß Helenalin in verschiedene Stoffwechselprozesse eingreift, die bei Entzündungsvorgängen eine Rolle spielen und zur Erklärung der Wirkung herangezogen werden können (u.a. Erhöhung des cAMP - Spiegels, Stabilisierung der Lysosomenmembran, Hemmung der Aktivität lysosomaler Enzyme). Diese biochemischen Parameter wurden durch Helenalin ebenfalls wirksamer beeinflußt als durch Indometacin. Die Prostaglandinsynthese wurde durch Helenalin dagegen erst bei einer Konzentration von 10^{-3} Mol gehemmt (Indometacin: 10^{-4} Mol), so daß dies bei den Helenanoliden nicht das wichtigste Ereignis bei der antiphlogistischen Wirksamkeit sein kann.

Bereits LEE et al. (1977a) hatten gefunden, daß Helenalin in Tumorzellen eine starke Hemmung der β-Hydroxy-β-methyl-

glutaryl-CoA-Reductase bewirkt (7 µMol: 67%-ige Hemmung) und in den tumortragenden Mäusen den Serum-Cholesterin-Spiegel um 39% senkt. In vivo Versuche an Mäusen von HALL et al. (1980) verifizierten diese starke antihyperlipidämische Wirkung von Helenalin, wobei die tägliche i.p. Applikation von 20 mg Helenalin/kg Maus am 8. bzw. 16. Tag eine Senkung des Serum-Cholesterin-Spiegels um 30% und des Serum-Triglycerid-Spiegels um 25% ergab. Clofibrat zeigte diese Wirkung erst bei einer Dosis von 300 mg/kg. In vitro Versuche ergaben, daß Helenalin die SH-Gruppen tragenden Enzyme der Lipidsynthese hemmt. Hierbei war wiederum die $H_2C = C - C = O$ - Gruppierung für die Aktivität verantwortlich.

Die bisher von den Helenanoliden bekannten und in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Wirkungen machen deutlich, daß es sich bei diesen Verbindungen um die wesentlichen Wirkstoffe der "Arnicae flos, DAB 8" handelt. Ihre hohe Aktivität resultiert aus einer Blockierung SH-Gruppen tragender Enzyme durch deren Alkylierung. Dieser relativ unspezifische Angriffspunkt erklärt das breite Wirkungsspektrum, das der Droge seit Jahrhunderten nachgesagt wird. Gleichzeitig geht jedoch daraus hervor, daß eine orale Verwendung von Arnikazubereitungen mit nicht definierter Zusammensetzung kritisch zu handhaben ist, und daß eine Standardisierung der entsprechenden Präparate auf diese Wirkstoffe hin gefordert werden muß. Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Identifizierung der wesentlichen Helenanolide der

Droge eröffnet den Weg zu dieser Standardisierung, die wegen der komplexen Zusammensetzung nicht ohne Schwierigkeiten durchführbar sein wird. Neben der Erarbeitung von Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Helenanolide sowie des Anteils der Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinderivate sind Untersuchungen zur Resorption, Verteilung, Akkumulation und Verweildauer dieser stark wirksamen Verbindungen im Organismus notwendig. Ohne solche Untersuchungen sind schädigende Auswirkungen bei einer oralen Therapie mit dieser Droge nicht auszuschließen.

F. Zusammenfassung

1. Aus "Arnicae flos, DAB 8", den Blütenkörbchen von Arnica montana L., wurden 15 Sesquiterpenlactone isoliert und durch UV-, IR-, MS- und ^{1}H-NMR-Analysen identifiziert. Es sind dies die Pseudoguaianolide Helenalin (1) und dessen Essigsäure- (2), Isovaleriansäure- (3), Isobuttersäure- (4), 2-Methylbuttersäure- (5), Tiglinsäure- (6) und α-Methacrylsäureester (7), 11,13-Dihydrohelenalin (8) und dessen Essigsäure- (9), Isovaleriansäure- (10), Isobuttersäure- (11), α-Methacrylsäure- (12) und Tiglinsäureester (13) sowie der Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester (14) und 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester (15). Von diesen Verbindungen waren nur die Substanzen 2, 7 und 9 als Drogeninhaltsstoffe bekannt. Bei sechs der zwölf für Arnikablüten neuen Verbindungen handelt es sich um erstmals in der Natur gefundene Sesquiterpenlactone (Verbindungen 3-6, 14 u.15).

2. In geringen Mengen wurde der Isovaleriansäureester eines weiteren Sesquiterpenlactons isoliert, bei dem es sich aufgrund der ^{1}H-NMR-spektroskopischen Daten um einen Strukturtyp handelt, der bisher nicht in der Gattung Arnica gefunden worden ist. Die Verbindung verdient aus biosynthetischen und chemotaxonomischen Gründen besonderes Interesse.

3. Blätter und Blütenkörbchen von A. montana unterscheiden sich in ihrer Sesquiterpenlactonführung. Erstere enthal-

ten lediglich 11,13-Dihydrohelenalin und dessen genannte Ester, letztere in vergleichbarer Menge zusätzlich Helenalin und die entsprechenden Ester. Als neues Pseudoguaianolid der Blätter wurde 11,13-Dihydrohelenalintiglinat identifiziert.

4. Die im Handel befindlichen Arnikablüten spanischer Herkunft unterscheiden sich im Sesquiterpenlactonspektrum von mitteleuropäischen Arnikablüten. Als Hauptkomponente führen die spanischen Blüten 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester, kein Helenalin und Helenalinacetat sowie nur geringe Mengen der anderen Helenalinester. Mit Wirkungsunterschieden bei den im Drogenhandel befindlichen Arnikablüten dieser unterschiedlichen Herkünfte muß gerechnet werden.

5. Systeme zur kapillargaschromatographischen Trennung und HPLC-Trennung der strukturell ähnlichen Sesquiterpenlactone werden mitgeteilt. Die GC/MS - Analyse ermöglicht eine sichere Identifizierung der Sesquiterpenlactone der Arnikablüten. Die Massenspektren der Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester erlauben eine Unterscheidung isomerer, ungesättigter Säuren mit und ohne α-ständiges Proton (z.B. Tiglin- und Seneciosäure).

6. Die antibiotische Wirkung von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat gegen gram-positive Bakterien wird nachgewiesen. Die im Verdünnungsreihentest ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen liegen unter-

halb von 100 µg/ml. Von den getesteten gram-negativen Keimen zeigte sich nur Proteus vulgaris in diesem Konzentrationsbereich sensibel, von den untersuchten Pilzen lediglich Botrytis cinerea. Für die Wirkung ist der ß-unsubstituierte Cyclopentenonring das entscheidende Strukturelement. Bei Botrytis cinerea wird die antibiotische Wirkung durch die Veresterung verstärkt.

7. Die identifizierten Sesquiterpenlactone sind das toxische Prinzip der Arnikablüten. Die akute Toxizität der Sesquiterpenlactonfraktion aus Arnikablüten wurde an Mäusen nach oraler und i.p. Applikation bestimmt. Die LD_{50}-Werte betragen 123 mg bzw. 31 mg/kg Körpergewicht.

8. Die i.p. Applikation der Sesquiterpenlactonfraktion (5 mg/kg/Tag; vier Tage lang) führt bei Mäusen zu einer Verdopplung der Barbituratschlafzeit. Eine signifikante Schlafzeitverlängerung tritt noch eine Woche nach Verabreichung der Sesquiterpenlactone auf.

9. Am isolierten, spontan schlagenden rechten Vorhof und am linken, elektrisch gereizten Vorhof sowie am isolierten, intakten Papillarmuskel des Meerschweinchens zeigt Helenalinacetat eine positiv inotrope Wirkung (10^{-6} bis 10^{-4} molare Lösungen). Bei längerer Helenalinacetat-Einwirkung und bei den höheren Konzentrationen kommt es zu einer Herzschädigung.

10. Die bekannten biologischen und pharmakologischen Wirkungen der Sesquiterpenlactone werden in Zusammenhang mit den beschriebenen Arnikawirkungen diskutiert. Die identifizierten Verbindungen dieser Stoffklasse müssen danach als die wesentlichen Wirkstoffe der Arnikablüten angesehen werden.

G. Experimenteller Teil

1. Herkunft der Drogen

Die Blütenkörbchen von Arnica montana L. wurden an natürlichen Wuchsorten bei Maienwasen/Maienplatt (Höhe 1600 m) und Gampen/Kapall (Höhe 1900 m) im Arlberggebiet, Österreich, gesammelt. Die Trocknung erfolgte bei ca. 40°C im Trockenschrank. Die Droge wurde ohne weitere Lagerung sofort extrahiert. Die Aufbewahrung der Extrakte erfolgte bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung unter Stickstoff bei -20°C. Weitere Blütendroge jugoslawischer und spanischer Herkunft wurde über die Firma CAELO, Hilden/Rheinland, bezogen.

2. Spektroskopische Methoden

Die Aufnahme der UV - Spektren und die Messung der molaren Extinktion erfolgte mit dem Spektralphotometer Typ DB-G der Firma BECKMANN bei Zimmertemperatur in Methanol (Uvasol).

Die Infrarot - Spektren wurden mit dem Spektralphotometer 297 der Firma PERKIN-ELMER aufgenommen. Die Untersuchungen erfolgten in KBr-Preßlingen.

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer, Typ VARIAN MAT CH 7 A bei einer Ionisationsspannung von 70 eV aufgenommen*.

---

*Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die Aufnahme der Massenspektren.

Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden mit dem VARIAN - Spektrometer CFT im Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf* sowie mit dem Spektrometer WH-360 der Firma BRUKER-PHYSIK bei der BAYER AG*, Leverkusen, aufgenommen. Als Lösungsmittel diente jeweils $CDCl_3$, als innerer Standard TMS. Die mit dem 360 MHz-Gerät aufgenommenen Spektren sind durch die Angabe der chemischen Verschiebungen mit drei Stellen hinter dem Komma gekennzeichnet.

3. Bestimmung der physikalischen Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch LEITZ, Typ 350, bestimmt. Sie sind unkorrigiert.

Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mit dem Polarimeter Typ 243 der Firma PERKIN-ELMER bei 20°C in $CHCl_3$ (Uvasol), sofern nicht anders angegeben.

4. Chromatographische Methoden

4.1. Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren

Für die analytische DC wurden Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten (MERCK) verwendet. Die Laufstrecke betrug in der Regel 12 cm bei Kammersättigung. Die Verhältnisangaben bei den

---

*Herrn Dr. H.-J. Hemmerling, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die Aufnahme der 80 MHz-Spektren und Herrn Dr. D. Wendisch, BAYER AG, Leverkusen, für die der 360 MHz-Spektren.

Fließmittelgemischen beziehen sich jeweils auf Volumenteile. Als Standardsystem diente das Fließmittelgemisch n-Pentan/Ether 32:68 (WILLUHN u. HERRMANN, 1978). Für die Sl - Gesamtfraktion erwiesen sich ferner folgende Laufmittelsysteme als geeignet:

n-Hexan/Isopropanol, 77:23; Benzol/Ether, 50:50; Petrolether/Aceton/wassergesättigter Ether, 40:30:30.

Die Fraktionen IX, X, XI und XII des Extraktes A wurden mit $CHCl_3$/Aceton, 60:10, aufgetrennt (PICMAN et al., 1980).

Zur Detektion der Sl wurden folgende Sprühreagenzien eingesetzt:

a) ZIMMERMANN-Reagenz (NEHER, 1964)

A) 10 g 1,3-Dinitrobenzol + 90 ml Benzol

B) 6 g NaOH + 25 ml H_2O + 45 ml Methanol

Zunächst wird mit Lösung A besprüht, anschließend mit Lösung B. Während des Besprühens erscheinen die Helenalinester blauviolett, die Dihydrohelenalinderivate rotviolett. Die Farbe verblaßt beim Liegenlassen der Platte.

b) Hydroxylamin/$FeCl_3$ (FEIGL et al., 1934; STAHL, 1962)

A) 10 g Hydroxylaminhydrochlorid + 90 ml H_2O

B) 20 g NaOH + 80 ml H_2O

C) 2 g $FeCl_3$ + 20 ml HCl (37%) + 78 ml H_2O

Lösung A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt; nach Besprühen der Platte mit diesem Gemisch wird sie ca. 10 Min. lang auf 100° - 110°C erwärmt. Nach Abkühlen wird mit Lösung C detektiert. Die Sl reagieren dabei unter Braunfärbung.

c) Anisaldehyd/H_2SO_4 (STAHL, 1962)

1 ml Anisaldehyd + 97 ml Essigsäure (99 - 100%) + 2 ml H_2SO_4 (95 - 97%).

Nach dem Besprühen wird die Platte bis zur Farbdifferenzierung auf 110°C erwärmt (ca. 5 - 10 Min.). Die Helenalinderivate reagieren unter Gelbfärbung.

d) 2,4-Dinitrophenylhydrazin (STAHL, 1962)

0,1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin + 1 ml HCl (37%) + 100 ml Ethanol (96vol.%).

Die Helenalinderivate erscheinen nach einiger Zeit als gelb bis orange gefärbte Flecken.

e) EP - Reagenz (STAHL, 1962)

0,25 g p-Dimethylaminobenzaldehyd + 5 g o-H_3PO_4 (85%) + 50 g Essigsäure (99 - 100%) + 20 ml H_2O.

Proazulene reagieren nach dem Besprühen und dem Erwärmen auf 110°C für ca. 10 Min. unter Blaufärbung.

4.2. Säulenchromatographie

Als Sorbentien für die sc Auftrennung der Sl - Extrakte wurden neutrales Aluminiumoxid, Alumina WOELM N - Super I, und Kieselgel 60 (70 - 230 mesh; MERCK) für die Säulenchromatographie verwendet. Die Säulenfüllung erfolgte durch Einschlämmen des Adsorbens. Das zu trennende Substanzgemisch wurde am Trägermaterial adsorbiert (1:1), auf die Säule gegeben und mit wenig Adsorbens und Seesand p.a. abgedeckt.

4.3. Gaschromatographie

Verwendet wurden der Gaschromatograph 2700 der Firma VARIAN in Verbindung mit dem Schreiber VARIAN A 25 und Helium als Trägergas sowie der Gaschromatograph F 22 mit dem Schreiber Typ 56 der Firma PERKIN-ELMER und Stickstoff als Trägergas. Letzteres Gerät wurde für die Kapillargaschromatographie zur Nachbeschleunigung des Trägergases am Säulenausgang durch Einbau einer Make up - Gasleitung umgerüstet. Beide Geräte waren mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet. Der Papiervorschub betrug jeweils 1 cm/Min. Folgende Trennsysteme wurden verwendet:

System I : Glaskapillarsäule 6 m OV-101 (MACHEREY & NAGEL) Temperaturprogramm 120°C - 230°C (Anstiegrate: 10°C/Min.); Trägergas: Helium, 1 bar; Splitverhältnis 1:10; Injektortemperatur: 250°C; Detektortemperatur: 270°C.

System II : Glaskapillarsäule 15 m OV-1 (MACHEREY & NAGEL) Temperaturprogramm 200°C - 250°C (Anstiegrate: 10°C/Min.); Trägergas: Helium, 1 bar; Splitverhältnis 1:10; Injektortemperatur: 250°C; Detektortemperatur: 270°C.

System III : Glaskapillarsäule 25 m DUHT OV-101 (MACHEREY & NAGEL); Temperaturprogramm 180°C - 250°C (Anstiegrate: 10°C/Min.); Trägergas: Stickstoff, 0,5 bar; Splitverhältnis 1:10; Injektortemperatur: 250°C; Detektortemperatur: 270°C.

Die Retentionszeiten der isolierten Sl - Ester in den drei Systemen sind in Tabelle 21 wiedergegeben.

System IV : Glaskapillarsäule 12 m Carbowax 20 M (MPI für Kohlenforschung; Mühlheim/Ruhr); Temperaturprogramm 100°C - 220°C (Anstiegrate: 10°C/Min.); Trägergas: Stickstoff, 0,5 bar; Splitverhältnis 1:10; Injektortemperatur: 250°C; Detektortemperatur: 270°C.

Tab. 21: Retentionszeiten der isolierten Sesquiterpenlacton - Ester in Minuten
H = Helenalin; DH = 11,13-Dihydrohelenalin;
TH = Tetrahydrohelenalin; n.b. = nicht bestimmt

Substanz	System I	System II	System III
H-acetat	5,70	n.b.	5,15
DH-acetat	5,90	n.b.	5,25
H-isobutyrat	6,10	4,05	5,80
DH-isobutyrat	6,25	4,25	6,00
H-methacrylat	6,60	4,45	6,15
DH-methacrylat	6,75	4,60	6,28
H-2-methylbutyrat	6,90	4,95	6,50
H-isovalerianat	7,00	5,05	6,55
DH-isovalerianat	7,25	5,25	6,68
H-tiglinat	7,80	6,70	7,35
DH-tiglinat	8,00	6,85	7,50
TH-isobutyrat	n.b.	4,18	5,88
2-Ethoxy-DH-isobutyrat	n.b.	5,20	7,15
unbek. Isovalerianat	n.b.	n.b.	6,63

4.4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die HPLC stand das präparative HPLC-Gerät 830 der Firma DUPONT mit dem UV - Spektrophotometer 837 (variable Wellenlängengebung) zur Verfügung. Als Schreiber war der Strip Chart Recorder 7130 A/B der Firma HEWLETT-PACKARD angeschlossen. Nach Ausfall der Pumpe wurde diese durch den Pumpenstand, Serie 1 der Firma PERKIN-ELMER ersetzt.

Die Elutionsgemische wurden im Ultraschallbad entgast. Die Verhältnisangaben beziehen sich auf Gewichtsprozent. Von den zu trennenden Teilfraktionen wurden ca. 10%-ige Lösungen im Elutionsgemisch hergestellt. Zur vollständigen Lösung war jeweils ein geringer Zusatz von CH_2Cl_2 nötig. Die Lösungen wurden vor der Aufgabe auf die Trennsäule durch eine SARTORIUS-Filterspritze (Glasfaser-Vorfilter, Typ SM 13400)

Abb. 50 HPLC - Trennung der Teilfraktion IV im System I

1 = 2-Ethoxy-DH-isobut.
2 = H-2-methylbutyrat
3 = H-isovalerianat
4 = H-isobutyrat
5 = TH-isobutyrat
6 = H-tiglinat
7 = H-methacrylat
H = Helenalin
DH = Dihydrohelenalin
TH = Tetrahydrohelenalin

gegeben. Die Detektion der Helenalinester erfolgte bei einer Wellenlänge von 220 nm, die der Dihydrohelenalinester bei 225 nm. Der Papiervorschub betrug 0,25 cm/Min. Folgende Trennsysteme wurden verwendet:

System I: Säule: ZORBAX-Sil 60, 7 µm (Firma DUPONT), Länge: 25 cm, innerer Durchmesser: 2,3 cm; mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol (92,5:7,5) zur Trennung der Teilfraktionen III, IV und V, n-Hexan/Isopropanol (90:10) zur Trennung der Fraktion VII sowie der Dihydrohelenalinesterfraktion aus der spanischen Droge. Aufgabemengen pro Durchlauf: Fraktion III: 600 µl = ca. 60 mg; Fraktion IV u. V: 350 µl = ca. 35 mg; Fraktion VII und DH-esterfraktion/Spanien: 300 µl = ca. 30 mg. Fluß: 25 ml/Min.

System II: Säule: µ-Porasil 10 µm (Firma WATERS). Länge: 25 cm, innerer Durchmesser: 1,2 cm und Nachschaltung einer 2. Säule: Polygosil 60 D 10 (Firma MACHEREY & NAGEL), Länge: 25 cm, innerer Durch-

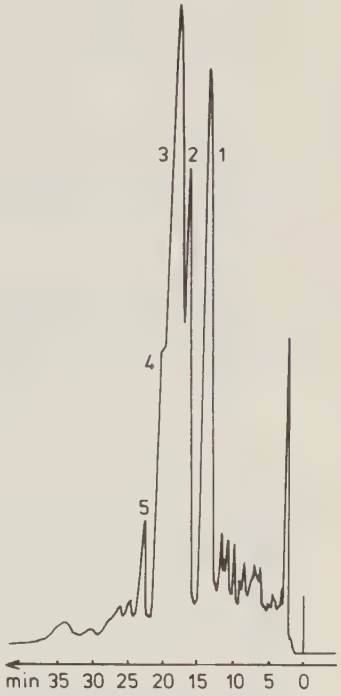


Abb. 51 HPLC - Trennung der Dihydrohelenalinesterfraktion im System I

1 = DH-isoval.
2 = DH-isobut.
3 = DH-tiglinat
4 = DH-methacryl.
5 = unbek. Isoval.
DH = 11,13-Dihydrohelenalin

messer: 1,6 cm; mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol (99:1). Aufgabemengen pro Durchlauf: Fraktion III: 250 µl = ca. 25 mg; Fraktion V: 200 µl = ca. 20 mg. Fluß: 15 ml/Min. Dieses System wurde neben System I zur Trennung der Helenalinesterfraktionen III und V herangezogen.

In Abbildung 50 bzw. Abbildung 51 ist die HPLC - Trennung der Fraktion IV bzw. die der 11,13-Dihydrohelenalinester-Fraktion aus der spanischen Droge wiedergegeben.

5. Isolierung der Sesquiterpenlactone

5.1. Gewinnung der Sesquiterpenlactonfraktionen

E x t r a k t A: In Anlehnung an POPLAWSKI et al. (1971) und HERRMANN (1978) wurden 3,25 kg getrocknete und gemahlene Blütendroge im Soxhlet mit Cyclohexan erschöpfend extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der hochviskose, braune Rückstand zu einer ca. 10%-igen Lösung verdünnt. Nach Abzug des Ethanols am Rotavapor wurde die wässerige, milchigtrübe, gelblichgrüne Phase 10 mal mit 100 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die vereinigten $CHCl_3$-Auszüge wurden über $CaCl_2$ getrocknet. Als Rückstand resultierten 31,95 g einer gelblichen, sirupartigen Fraktion. Sie wurde nach HERRMANN (1978) in wenig Ether aufgenommen und an 3,1 kg Alumina WOELM N Super I mit einem Petrolether/Benzol/$CHCl_3$/Methanol-Gemisch (5:4:1:2) sc gereinigt. Die Sl - haltigen Fraktionen (DC mit n-Pentan/Ether, 32:68) wurden vereinigt. Rückstand: 17,10 g (= 0,53% des Blütentrockengewichtes).

E x t r a k t B: Die mit Cyclohexan ausgezogene Droge wurde anschließend mit Aceton erschöpfend extrahiert und der viskose Extraktrückstand (5,30 g), wie bei "Extrakt A" beschrieben, unter Einsatz aliquoter Mengen Adsorbens, weiter gereinigt. Rückstand: 3,00 g (= 0,09% des Blütentrockengewichtes).

E x t r a k t C: 1,00 kg getrocknete und gepulverte Droge wurde erschöpfend mit H_2O extrahiert und die wässerige Lösung 5 mal mit 100 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die $CHCl_3$-Phase wurde über $CaCl_2$ getrocknet und am Rotavapor im Vakuum bis zur Sirupdicke eingedampft. Es resultierten 1,70 g eines klebrigen, braunen Rückstandes (= 0,17% des Blütentrockengewichtes).

E x t r a k t D: Die mit Wasser ausgezogene Droge wurde anschließend mit Methanol erschöpfend extrahiert. Der Extraktrückstand wurde nach dem Abziehen des Methanols im Vakuum in 700 ml Wasser aufgenommen und wie unter "Extrakt C" beschrieben weiterbehandelt. Danach verblieben 2,05 g eines gelbgrün gefärbten Rückstandes (= 0,20% des Blütentrockengewichtes).

E x t r a k t E: Die mit Methanol extrahierte Droge wurde mit Aceton extrahiert, der Rückstand des Acetonauszuges mit 300 ml H_2O versetzt und die wässerige Phase 5 mal mit 50 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Nach Abzug des $CHCl_3$ im Vakuum resultierten 0,87 g (= 0,09% des Blütentrockengewichtes).

E x t r a k t F: Die mit Aceton extrahierte Droge wurde weiter mit Petrolether ausgezogen. Der Rückstand (5,5 g) wurde wie unter "Extrakt A" beschrieben weiter gereinigt. Rückstand: 3,80 g (= 0,38% des Blütentrockengewichtes).

5.2. Fraktionierung der S1 - Gesamtfraktion (Extrakt A)

Der Extrakt A (17,10 g) wurde in wenig Ether aufgenommen, an der gleichen Menge Kieselgel 60 zur SC adsorbiert und in 3 gleichen Teilen an 3 Kieselgel 60 - Säulen mit einem n-Pentan/Ether-Gemisch (32v:68v) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen zu 15 ml aufgefangen, dc auf ihre Zusammensetzung untersucht und zu 12 Teilfraktionen vereinigt (s. Abb. 5, S. 19). Tabelle 22 gibt das Trennergebnis und die dc und gc ermittelte Anzahl an S1 in den Teilfraktionen wieder.

5.3. Isolierung der Sesquiterpenlactone

5.3.1. SC der Teilfraktionen III, IV, V und VII

Die Teilfraktionen wurden sc an Kieselgel 60 gereinigt, wobei das Verhältnis Adsorbens : S1 - Fraktion jeweils 150:1 betrug. Die Teilfraktionen III, V und VII wurden mit n-Pentan/Ether-Gemischen von der Säule eluiert. Die Zugabe von Ether erfolgte in 10%-Schritten nach jeweils 50 ml Elutionsmittel - Durchgang. Es wurden Fraktionen von 5 ml aufgefangen und gc auf ihre Zusammensetzung untersucht. Aus 200 mg, 400 mg und 300 mg der Teilfraktionen III, V bzw. VII wurden auf diese Weise 82 mg, 97 mg bzw. 103 mg einer weiter gereinigten S1 - Fraktion erhalten, deren qualitative Zusammen-

Tab. 22: SC - Auftrennung des Extrakts A an Kieselgel 60

Lsgm.: n-Pentan/Ether (32v:68v); DC: n-Pentan/Ether (32:68); Detektion: ZIMMERMANN - Reagenz; GC: System III; H: Helenalin; DH: Dihydrohelenalin; TH: Tetrahydrohelenalin

Fraktion	Menge	Anzahl an Sl nach		Verbindungen
		DC	GC	
I	0,29 g	-		-
II	0,50 g	-		-
III	0,67 g	1	2	H-2-methylbutyrat H-isovalerianat
IV	2,73 g	2	7	H-2-methylbutyrat H-isovalerianat H-isobutyrat H-methacrylat H-tiglinat TH-isobutyrat 2-Eth-DH-isobutyrat
V	3,76 g	1	3	H-isobutyrat H-methacrylat H-tiglinat
VI	0,36 g	2	6	H/DH-isobutyrat H/DH-methacrylat H/DH-tiglinat
VII	0,77 g	1	3	DH-isobutyrat DH-methacrylat DH-tiglinat
VIII	0,34 g	1	1	H-acetat (Spuren)
IX	0,71 g	1	1	H-acetat
X	0,28 g	1	1	DH-acetat
XI	1,70 g	3	1	DH-acetat; H; DH
XII	2,94 g	2	-	H; DH

setzung nicht verändert war (s. Abb. 6, S. 20, Abb. 11, S. 29 bzw. Abb. 26, S. 57).

Die Reinigung von 400 mg der Teilfraktion IV erfolgte mit dem Eluentengemisch n-Pentan/Ether (75v:25v). Hierbei fielen 77 mg der gereinigten Fraktion an.

5.3.2. Isolierung von Helenalin-2-methylbuttersäure- und Helenalinisovaleriansäureester

Die viskose, gelbliche, gereinigte Teilfraktion III (82,0 mg) wurde im HPLC - System I präparativ aufgetrennt. Dabei konnten 12,7 mg Helenalin-2-methylbuttersäureester gc einheitlich abgetrennt werden. Die aufgefangene Restfraktion, die neben anderen Komponenten zu etwa gleichen Teilen Helenalin-2-methylbuttersäure- und Helenalinisovaleriansäureester enthielt, wurde erneut im präparativen HPLC - System I getrennt und hierbei 20,1 mg des Estergemisches gc sauber aufgefangen.

5.3.3. Isolierung des Isobuttersäure-, α-Methacrylsäure- und Tiglinsäureesters von Helenalin

Die gereinigte Teilfraktion V (97 mg) wurde mit n-Pentan/Ether-Gemischen erneut an Kieselgel aufgetrennt. Dabei wurde der Etheranteil nach jeweils 60 ml um 10% gesteigert. Dieser Trenngang führte zu einer Fraktion von 43,0 mg mit hohem Anteil an Helenalinisobutyrat und zu einer Fraktion von 28,2 mg, die hauptsächlich Helenalinmethacrylat und -tiglinat enthielt. Aus der ersten Fraktion wurden im HPLC - System I 29 mg Helenalinisobutyrat gc einheitlich isoliert

und aus Ether/Petrolether umkristallisiert. Aus der zweiten Fraktion wurden durch 3 mal wiederholte Auftrennung im HPLC - System I 10 mg Helenalintiglinat und 6 mg des bereits bekannten Helenalinmethacrylats isoliert.

Helenalinmethacrylat: Schmp.: 117°C - 119°C; $\lambda_{max.}$: 212 nm; IR, cm^{-1}: Exomethylengruppe 3100, 1660, 1270, 818; Lacton 1762; Ketogruppe 1713; $\Delta^{2,3}$-Doppelbindung 1582; $\Delta^{17,18}$-Doppelbindung 1638; Ester 1718. MS: M^+ 330 (4%), m/z = 262 (5), 261 (9), 244 (53), 234 (3), 229 (22), 216 (26), 201 (12), 188 (11), 173 (17), 161 (17), 159 (12), 151 (3), 145 (19), 135 (8), 124 (5), 123 (11), 122 (19), 117 (18), 115 (12), 96 (2), 95 (12), 91 (12), 69 (100), 41 (33). ^{1}H-NMR (80 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm, δ-Skala): 7,59 dd (H-2), 6,02 dd (H-3), 5,37 s (H-6), 3,51 m (H-7), 4,82 (H-8), 1,24 d (C_{10}-Me), 1,01 s (C_5-Me), 6,46 d (H-13), 6,17 d (H-13'), 1,84 br s (C_{17}-Me), bei 5,5 m und 5,9 m (H-18 u. H-18').

5.3.4. Isolierung von Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester und 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester

Die gereinigte Teilfraktion IV (77 mg) wurde im HPLC - System I aufgetrennt. Ergebnis: 8 mg Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester und 11 mg 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester. Das Ethoxyderivat fiel nach Abziehen des Elutionsmittels kristallin an; der Tetrahydrohelenalinester kristallisierte aus Ether/Petrolether nach einigen Tagen im Kühlschrank. Die anderen Helenalinester der Fraktion wurden ebenfalls aufgefangen.

5.3.5. Alkalische Hydrolyse der 11,13-Dihydrohelenalinester

25 mg der gereinigten Teilfraktion VII (103 mg) wurden in Anlehnung an EVSTRATOVA et al. (1969) in 50 ml 4%-iger NaOH 3 Std. lang auf 60°C erwärmt. Nach Abkühlen der intensiv rot gefärbten Lösung wurde diese mit 10%-iger HCl auf pH 1,0 (Universal-Indikatorpapier) eingestellt und mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die $CHCl_3$-Phase wurde mit 4%-iger $NaHCO_3$-Lösung und mit Wasser bis zur neutralen Reaktion ausgeschüttelt. Diese Ausschüttelung wurde nach Ansäuern erneut mit $CHCl_3$ extrahiert. Nach dem Abziehen des über Na_2SO_4 sicc. getrockneten $CHCl_3$ verblieb ein viskoser, gelbgefärbter Rückstand der Estersäuren, die nach Aufnahme in wenig Ethylacetat direkt der GC - Analyse zugeführt wurden (System IV). Die Vergleichssäuren wurden über den Handel bezogen (MERCK u. ALDRICH). Angelicasäure wurde aus Tiglinsäure synthetisiert (s. S. 157).

5.3.6. Isolierung des Isobuttersäure- und Tiglinsäureesters von 11,13-Dihydrohelenalin

Die gereinigte Teilfraktion VII (103 mg) wurde im präparativen HPLC - System I aufgetrennt. Dabei wurden 18 mg 11,13-Dihydrohelenalinisobuttersäureester gewonnen. Die Verbindung wurde aus Ether/Petrolether umkristallisiert. 11,13-Dihydrohelenalintiglinat konnte erst nach 4 maliger Wiederholung der präparativen HPLC - Trennung in einer Ausbeute von 12 mg gc einheitlich gewonnen werden. Das Verhältnis des Elutionsmittelgemisches n-Hexan/Isopropanol

wurde dabei auf 95g:5g und der Fluß auf 55 ml/Min. abgeändert. Daneben wurde ein 11,13-Dihydrohelenalintiglinat/-α-methacrylat-Gemisch aufgefangen.

5.3.7. Isolierung von Helenalinessigsäureester

In der Teilfraktion IX fielen bereits bei der Fraktionierung des Extraktes A nach Abziehen des Elutionsmittels bzw. beim Stehen der Fraktion weiße Kristalle an (200 mg), bei denen es sich um Helenalinacetat handelte.

Helenalinacetat: Schmp.: 181°C - 183°C (Ether). $\lambda_{max.}$: 220 nm (ϵ = 12650). $[\alpha]_D^{20}$: -92,5° (c = 1,5, Aceton). IR, cm^{-1}: Exomethylengruppe 3105, 1658, 1272, 822; Lacton 1762; Ketogruppe 1715; $\Delta^{2,3}$-Doppelbindung 1578; Ester 1732. MS: M^+ = 304 (3%), m/z = 262 (18), 261 (7), 244 (76), 234 (9), 229 (19), 216 (12), 188 (12), 173 (23), 161 (21), 159 (19), 151 (11), 145 (18), 135 (10), 124 (40), 123 (22), 122 (19), 117 (22), 115 (18), 96 (20), 95 (18), 91 (17), 43 (100). ^{1}H-NMR (80 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm, δ-Skala): 2,98 m (H-1), 7,58 dd (H-2), 6,02 dd (H-3), 5,34 br s (H-6), 3,48 m (H-7), 4,83 ddd (H-8), 6,40 d (H-13), 6,08 d (H-13'), 1,24 d (C_{10}-Me), 1,01 s (C_5-Me), 1,97 s (C_{16}-Me).
DC und GC identisch mit Helenalinacetat.

5.3.8. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalinessigsäureester

Dihydrohelenalinacetat kristallisierte aus der Teilfraktion X des Extraktes A aus (28 mg).

Dihydrohelenalinacetat: Schmp.: 177°C - 178,5°C (Ether). $\lambda_{max.}$: 226 nm (ϵ = 8080). $[\alpha]_D^{20}$: -109,8° (c = 1,8, $CHCl_3$). IR, cm^{-1}: Lacton 1770; Keton 1705; $\Delta^{2,3}$-Doppelbindung 1575; Ester 1732. MS: M^+ = 306 (4%), m/z = 264 (13), 263 (7), 246 (60), 236 (8), 231 (73), 218 (6), 203 (5), 190 (6), 175 (9), 173 (16), 159 (9), 147 (13), 145 (13), 135 (13), 124 (30), 123 (20), 122 (25), 119 (6), 105 (7), 96 (8), 95 (24), 91 (13), 43 (100). ^{1}H-NMR (80 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm, δ-Skala): 2,98 m (H-1), 7,60 dd (H-2), 6,00 dd (H-3), 5,39 br s (H-6), 2,80 m (H-7), 4,71 ddd (H-8), 3,05 m (H-11), 1,49 d (C_{11}-Me), 1,21 d (C_{10}-Me), 1,01 s (C_5-Me), 1,92 s (C_{16}-Me).
DC und GC identisch mit Dihydrohelenalinacetat.

5.3.9. Acetylierung der Teilfraktion XII (Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin)

Die Teilfraktion XII wurde nach LEE et al. (1973) mit Essigsäurechlorid in Benzol acetyliert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das überschüssige Acetylchlorid aus dem Gemisch abdestilliert. Die acetylierte Fraktion wurde der DC -, GC - und GC/MS - Analyse zugeführt.

6. Herstellung der Sl - Extrakte zum DC - Vergleich von Arnikablüten verschiedener Herkünfte

Jeweils 5,0 g der getrockneten und gepulverten Blütenköpfchen von Arnikablüten der Herkünfte "Gampen/Kapall, Arlberg/Tirol", "Westerheide/Sylt", "Hunsrück", Handelsdroge "Spanien" und Handelsdroge "Jugoslawien" wurden mit 50 ml Cyclo-

hexan bei 40°C auf dem Magnetrührer 15 Min. extrahiert. Nach Filtrieren und Nachwaschen des Filters mit warmem Cyclohexan wurde das Filtrat im Vakuum von Extraktionsmittel befreit und die zähflüssigen, braungelben Rückstände jeweils mit 25 ml Ethanol (60 vol.%) kräftig geschüttelt und erneut filtriert. Die schwach gelb gefärbten Ethanollösungen wurden am Rotavapor bis zur Alkoholfreiheit eingedampft, die wässerige, milchigtrübe Phase mit Wasser auf 25 ml ergänzt und 5 mal mit je 10 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die Rückstände dieser Ausschüttelungen wurden über eine Säule mit 20 g Alumina WOELM N Super I mit dem Elutionsmittelgemisch Petrolether/Benzol/$CHCl_3$/Methanol (5v:4v:1v:2v) filtriert. Die ersten 10 ml des Eluats wurden verworfen und die folgenden 25 ml am Rotavapor zur Trockene eingedampft. Nach Aufnahme der Rückstände in wenig $CHCl_3$ wurden diese der DC - Analyse zugeführt. Tabelle 23 gibt die Menge der bei diesem Aufarbeitungsgang erhaltenen S1 - Extrakte wieder.

Tab. 23: S1 - Extrakte aus Arnikablüten verschiedener Herkünfte

Drogenherkünfte	Blüten in g	S1 - Fraktion in g	%
Gampen/Kapall, Tirol	5,0	0,052	1,04
Westerheide/Sylt	5,0	0,049	0,98
Hunsrück	5,0	0,048	0,96
Jugoslawien	5,0	0,029	0,58
Spanien	5,0	0,040	0,80

7. Isolierung von 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester und eines unbekannten Sesquiterpenlactonisovaleriansäureesters aus Arnikablüten spanischer Herkunft

7.1. Herstellung und Fraktionierung des S1 - Extraktes

1,0 kg getrocknete und pulverisierte Droge (Firma CAELO, Hilden; Herkunft: Spanien) wurden nach dem für den Extrakt A beschriebenen Verfahren aufgearbeitet (S. 146). Der Extrakt (4,2 g) wurde an Kieselgel 60 im Elutionsgemisch n-Pentan/Ether (32v:68v) sc aufgetrennt. Die Dihydrohelenalinester enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (1,8 g) und mit n-Pentan am selben Sorbens erneut sc aufgetrennt. Nach 250 ml wurde dem Pentan 10% Ether zugegeben und der Etheranteil nach weiteren 250 ml jeweils um 10% gesteigert. Es wurden 227 mg der Dihydrohelenalinester - Fraktion erhalten, die der präparativen HPLC zugeführt wurden.

7.2. Isolierung des Isovaleriansäureesters von 11,13-Dihydrohelenalin und eines unbekannten Sesquiterpenlactons

Bei der präparativen HPLC - Trennung der Dihydrohelenalinester - Fraktion im System I (s. Abb. 51, S. 145) fielen 95 mg 11,13-Dihydrohelenalinisovaleriansäureester gc einheitlich an. Er kristallisierte nadelförmig aus Ether/Petrolether. Der farblose, unbekannte Ester (7 mg nach HPLC - Trennung) war nicht zur Kristallisation zu bringen.

8. Synthese der Isovaleriansäure-, Isobuttersäure- und Tiglinsäureester von Helenalin

In Anlehnung an LEE et al. (1973) wurden je 3mg Helenalin mit jeweils 4 mg des entsprechenden Säurechlorids in 10 ml getrocknetem Benzol unter Rückfluß erhitzt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde dc überprüft. Der Ansatz wurde je 2 mal mit 10 ml einer 5%-igen $NaHCO_3$-Lösung und danach mit 10 ml einer gesättigten NaCl-Lösung ausgeschüttelt und die Benzolphase über Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Nach dem Abziehen des Benzols im Vakuum lag jeweils ein öliges, gelbliches Produkt vor, das in wenig $CHCl_3$ aufgenommen direkt zum dc und gc Vergleich sowie für die GC/MS - Analyse herangezogen wurde. Isovaleriansäure- und Isobuttersäurechlorid stammten von MERCK. Tiglinsäurechlorid wurde durch Erhitzen von Tiglinsäure (ALDRICH) mit $SOCl_2$ unter Rückfluß synthetisiert.

9. Darstellung von Angelicasäure (BUCKLES u. MOCK, 1950)

1,0 g Tiglinsäure (0,01 Mol) in 20 ml wasserfreiem Tetrachlorkohlenstoff wurde nach Zusatz von 1,6 g Brom (0,01 Mol) über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag unter Rückfluß erhitzt, bis eine leichte orange Färbung auftrat. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der feste Rückstand aus Petrolether umkristallisiert. Es resultierten 1,8 g an α,β-Dibromo-α-methylbuttersäure.

1,3 g der Dibromosäure wurden in 10 ml Methanol gelöst und mit 7 g 25%-iger methanolischer KOH versetzt. Nach Zugabe

von 1 g wasserfreiem K_2CO_3 zur Verhinderung einer Decarboxilierung wurde der Ansatz 2 Std. lang bei 50°C - 55°C gehalten. Nach Einleiten von CO_2 zur Entfernung von überschüssigem KOH wurde die Reaktionslösung warm filtriert, das auf dem Filter gesammelte Salz mit 50 ml warmem Methanol gewaschen und die vereinigten methanolischen Lösungen im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in etwas Wasser aufgenommen und mit 6N-HCl (Kongorot) angesäuert. Das abfiltrierte Reaktionsprodukt wurde aus Petrolether umkristallisiert und getrocknet. Ausbeute: 0,54 g β-Bromangelicasäure.

0,18 g der β-Bromangelicasäure wurden in 20 ml auf 5°C abgekühltem Wasser gelöst, mit 4 g 9%-igem Natriumamalgam versetzt und langsam 6 Std. lang auf dem Magnetrührer verrührt. Der wässerige Anteil wurde vom Quecksilber abgetrennt und dieses mit wenig Wasser nachgewaschen. Nach Ansäuern der vereinigten wässerigen Phasen mit HCl konz. (Kongorot) wurden diese mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Im Rückstand der Chloroformausschüttelung fielen 0,075 g Angelica- und Tiglinsäure im Verhältnis 2:1 an.

Zur Natriumamalgam - Darstellung wurden 0,36 g Natrium zu 3,64 g Quecksilber in einen DURAN - Erlenmeyerkolben gegeben und bis zum Einsetzen der exothermen Reaktion auf 40°C erwärmt. Um ein Herausspritzen von Quecksilber zu vermeiden, wurde der Kolben mit einem Asbestnetz abgedeckt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Amalgam mit einem Hornspatel entnommen und in kleine Stücke zerteilt.

10. Herstellung des Sl - Extraktes zur Bestimmung der LD_{50} und der Hexobarbitalschlafzeit

Zur Bestimmung der LD_{50} und der Barbituratschlafzeit wurden 1,0 g des Extraktes A aus Arnikablüten österreichischer Herkunft durch Trockensäulenchromatographie (LOEV u. GOODMAN, 1967) an 250 g Silica WOELM TSC (Schlauchfolie "Rilsau", Durchmesser 3 cm) mit n-Pentan/Ether (32:68) aufgetrennt. Die mit einer Rasierklinge herausgeschnittenen Zonen wurden mit 250 ml Methanol/$CHCl_3$ (1v:2v) über Nacht am Magnetrührer extrahiert und nach Filtration dc überprüft (n-Pentan/Ether, 32:68). Alle Fraktionen, die in ihrer Laufhöhe oberhalb der Helenalinisovaleriansäureester lagen, wurden verworfen; die übrigen wurden durch eine SARTORIUS-Filterspritze (Glasfaser-Vorfilter, Typ SM 13400) gegeben und im Vakuum zur Trockne gebracht (600 mg). Von diesem angereicherten Extrakt wurde eine 2%-ige Lösung in Sonnenblumenöl bereitet, die entsprechend der zu verabreichenden Extraktmengen pro kg Körpergewicht weiter mit Sonnenblumenöl verdünnt wurde.

11. Versuchsanordnung für die Untersuchung der Herzwirkung von Helenalinacetat

Zwei Meerschweinchen mit einem Gewicht von 508 g bzw. 600 g wurden durch Nackenschlag getötet, der Brustraum eröffnet, das Herz herausgeschnitten und in KREBS - HENSELEIT - Lösung in ein vorgewärmtes (31°C) und mit Carbogen (95% O_2/5% CO_2) durchperltes Präparierbad gebracht. Der linke Vorhof wurde

abgetrennt und auf eine Elektrode mit Platin/Iridium - Drähten aufgebunden. Die Elektrode wurde in einem Badgefäß fixiert, das mit 50 ml KREBS - HENSELEIT - Lösung gefüllt, mit Carbogen durchperlt und mittels eines Wassermantels und eines angeschlossenen Thermostaten auf einer Temperatur von 31°C konstant gehalten wurde. Die Reizung der Vorhöfe erfolgte mit Rechteckimpulsen von 1 msec Dauer, einer Frequenz von 1 Hz und 2,5-facher Schwellenstromspannung (60 Schläge/Min.). Über eine UC_2-Zelle als Druckaufnehmer wurden die Kontraktionen auf einen Hellige - Schreiber übertragen und fortlaufend registriert. Die Eichung betrug 4 g = 4 cm bei einer Vorspannung von 1 g.

Der rechte Vorhof wurde auf gleiche Weise präpariert und im Bade fixiert. Etwa 15 - 20 Min. nach Einhängen der Vorhöfe in das Organbad hatten diese eine konstante Kontraktionsamplitude und Schlagfrequenz erreicht. Erst danach wurde mit der Zugaben von Helenalinacetat begonnen.

Die KREBS - HENSELEIT - Lösung wurde nach einer Vorschrift von KREBS u. HENSELEIT (1932) bereitet. Von Helenalinacetat wurden zwei Stammlösungen in 60%-igem Ethanol hergestellt:

Lösung A: 30,4 mg Helenalinacetat gelöst in 6 ml Ethanol reinst (MERCK) + 4 ml H_2O = 10 ml einer 10^{-2} molaren Lösung.

Lösung B: 15,2 mg Helenalinacetat gelöst in 6 ml Ethanol reinst (MERCK) + 4 ml H_2O = 10 ml einer $5x10^{-3}$ molaren Lösung.

Für eine Badendkonzentration von $5x10^{-6}$ Mol Helenalinacetat wurden dem 50 ml Bad 0,05 ml der Lösung B zugefügt. Die Zugabe von weiteren 0,05 ml der Lösung B führte zur Badendkonzentration von 10^{-5} Mol. Die Konzentration von $2x10^{-5}$, $4x10^{-5}$, $6x10^{-5}$ und $8x10^{-5}$ Mol wurden durch erneute Zugabe von 0,05 ml bzw. jeweils 0,1 ml der Lösung A zum Bade erreicht. Diese kumulative Zufügung von Helenalinacetat wurde immer vorgenommen, wenn sich nach Ansteigen der Kontraktionskurve ein neues Kontraktionsplateau eingependelt hatte, was jeweils nach ca. 15 - 20 Min. der Fall war.

12. Testorganismen, Nährmedien und Methode der antibiotischen Testversuche

Zur Prüfung der antibiotischen Aktivität von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat wurden die in Tabelle 24 aufgeführten Mikroorganismen herangezogen. Folgende Nährmedien wurden für ihre Kultivierung benutzt:

Nährmedium 1: 6,7 g Bacto Yeast Nitrogen Base, 4,0 g Glucose, 15,0 g Agar, 1000 ml H_2O

Nährmedium 2: 20,0 g Malzextrakt, 15,0 g Agar, 1000 ml H_2O

Nährmedium 3: 4,0 g Hefeextrakt, 10,0 g Malzextrakt, 4,0 g Glucose, 15,0 g Agar, 1000 ml H_2O

Nährmedium 4: 8,0 g Bacto Nutrient Broth, 1000 ml H_2O

Bacto Yeast Nitrogen Base, Bacto Nutrient Broth, Hefeextrakt und Agar wurden von den DIFCO Laboratories, Detroit, USA bezogen, Glucose von Deutsche Maizena Werke, Hamburg, und Malzextrakt von der Firma Dr. Fränkle & Max Eck, Fellbach.

Tab. 24: Herkunft der Testorganismen und Kulturbedingungen

Testorganismen	Herkunft	Stamm-Nr.	Nährmedium	Temp.
Bakterien				
Arthrobacter citreus		17775		27°C
Bacillus brevis		9999		37°C
Bacillus subtilis		6633		37°C
Corynebacterium insidiosum		10253		27°C
Escherichia coli		10536		37°C
Micrococcus roseus		186		27°C
Mycobacterium phlei	ATCC	10142	4	37°C
Proteus vulgaris		13315		37°C
Pseudomonas fluorescens		10796		27°C
Staphylococcus aureus		6538 P		37°C
Streptomyces viridochromogenes		3356		37°C
Sarcina lutea		9341		27°C
Xanthomonas oryzae		21754		27°C
Hefeartig wachsende Pilze				
Hansenula anomala	CBS	1683		
Microstroma juglandis	WQ	2179	1	27°C
Nadsonia fulvescens	CBS	2596		

Pichia farinosa	CBS	5013		
Rhodotorula glutinis	CBS	6020		
Saccharomyces cerevisiae	CBS	2978	1	27°C
Schizosaccharomyces pombe	CBS	4100		
Mycelartig wachsende Pilze				
Aspergillus panamensis		120.45	2	
Botrytis cinerea		124.58	3	
Entomophthora sphaerosperma		216.66	3	
Fusarium solani	CBS	318.73	3	27°C
Mucor mucedo		542.66	3	
Penicillium chrysogenum		196.46	2	
Rhizoctonia solani		325.47	3	

ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau for Schimmelcultures, Niederlande; WQ: Herbar, W. Quack

Der Reihenverdünnungstest wurde nach der Methode von KAVANAGH (1963) durchgeführt. Von den Bakterien wurden Über-Nacht-Kulturen angelegt und von diesen mit einer Pasteurpipette 2-3 Tropfen in 10 ml Nährlösung übertragen, so daß hier eine Konzentration von ca. 10^6 Keimen/ml vorhanden war (Keimmedium). Jeweils 1 µg, 10 µg und 100 µg in Methanol gelöstes Helenanolid wurde in sterile Reagenzgläser einpipettiert, das Lösungsmittel eingedampft und die Helenanolide im Ultraschallbad in 0,5 ml Nährlösung gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml

des Keimmediums und Durchschütteln wurde die Kultur bei der jeweiligen für den Mikroorganismus optimalen Wachstumstemperatur (s. Tab. 24, S. 162) 24 Std. lang stehen gelassen. Parallel dazu wurden entsprechende Kulturen ohne Helenanolidzusatz angelegt und das Keimwachstum in beiden Kulturen nach 24 Std. im durchscheinenden Licht verglichen. Die MHK-Werte wurden durch entsprechende Zwischenkonzentrationen weiter eingeengt.

Beim Plattendiffusionstest (ZÄHNER, 1965) wurden die Filterpapierrondellen (Durchmesser 6 mm) mit helenanolidhaltiger Lösung getränkt und nach dem Trocknen auf die Testplatten gelegt. Die Hemmhöfe wurden, abhängig vom verwendeten Testorganismus, nach 12 - 48 Std. abgelesen. Die Testplatten wurden mit 15 ml Nährmedium unter Zufügung der Sporen-, Zell- oder Mycelsuspensionen einschichtig gegossen.

H. Literaturverzeichnis

ADAMS, R. u. W. HERZ: Helenalin. I. Isolation and properties; J. Am. Chem. Soc. 71, 2546-2551 (1949)

BECKER, H. Aktuelle Drogenverfälschungen; Pharmazeutische Zeitung 116, 227 (1971)

BEETZ, D.G., G. WÜRBACH u. H.-J. CRAMER: Allergenanalytische Untersuchungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bei Überempfindlichkeit gegenüber Arnikatinktur; Allerg. u. Immunol. 17, 228-234 (1971)

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Neue Thymolderivate aus Arnica amplexicaulis; Tetrahedron Let. 28, 2827-2828 (1973)

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Natürlich vorkommende Terpenderivate, 63: Über die Inhaltsstoffe von Heterotheca inuloides Cass; Chem. Ber. 109, 2021-2025 (1976)

BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA, A. SUWITA, A. SUWITA, A.A. NATU, C. ZDERO, W. DORNER, D. EHLERS u. M. GRENZ: Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus Vertretern der Eupatorium-Gruppe; Phytochemistry 16, 1973-1981 (1977)

BOHLMANN, F., C. ZDERO, R.M. KING u. H. ROBINSON: Neue Elemanolide und Guajanolide aus Zinnia-Arten; Phytochemistry 18, 1343-1348 (1979)

BOHLMANN, F., L.N. DUTTA, H. ROBINSON u. R.M. KING: Neue Sesquiterpenlactone aus Eupatorium sessilifolium; Phytochemistry 18, 1401-1403 (1979)

BOHLMANN, F., J. ZIESCHE, H. ROBINSON u. R.M. KING: A pseudoguaianolide and a hydroxygeranylnerol from Kingianthus paradoxus; Phytochemistry 20, 1146-1148 (1981)

BUCKLES, R. u. G. MOCK: The preparation of tiglic and angelic acids and esters; J. Org. Chem. 15, 680-684 (1950)

CAVALLITO, C.J. u. T.H. HASKELL: α-Methylene butyrolactone from Erythronium americanum; J. Am. Chem. Soc. 68, 2333-2334 (1946)

CLARK, E.P.: Helenalin. I. Helenalin, the bitter sternutative substance occuring in Helenium autumnale; J. Am. Chem. Soc. 58, 1982-1983 (1936)

COOPER, J.R. u. B.B. BRODIE: The enzymatic metabolism of hexobarbital (Evipal); J. Pharmacol. Exptl. Therap. 114, 4o9-417 (1955)

DEUEL, P.G. u. T.A. GEISSMAN: Xanthinin. II. The structures of Xanthinin and Xanthatin; J. Am. Chem. Soc. 79, 3778-3783 (1957)

Deutsches Arzneibuch, 8. Ausgabe 1978; Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1978

Deutsches Homöopathisches Arzneibuch, 1. Ausgabe 1978, 1. Nachtrag 1981; Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1981

DOMINGUEZ, X.A., R, FRANCO, F. BOHLMANN u. R. BOHLMANN: A pseudoguaianolide from Hymenoxys linearifolia; Phytochemistry 19, 2204-2205 (1980)

DUPUIS, G., J.C. MITCHELL u. G.H.N. TOWERS: Reaction of Alantolactone, an allergenic sesquiterpene lactone, with some amino acids. Resultant loss of immunologic reactivity; Can. J. Biochem. 52, 575-581 (1974)

DUQUÉNOIS, P.: Une planta medicinale encore mystèrieuse, l'Arnica montana; Pharm. Weekbl. 106, 190-197 (1971)

EVANS, F.J. u. R.J. SCHMIDT: Plants and plant products that induce contact dermatitis; Planta Med. 38, 289-316 (1980)

EVSTRATOVA, R., V. SHEICHENKO, K. RYBALKO u. A. BAN'KOVSKII: The structure of arnifolin, sesquiterpene lactone from A. foliosa Nutt. and A. montana L.; Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal 3, (9), 39-45 (1969)

FABER, K.: Die Arnika (Arnica montana); Pharmazie 8, 179-187 u. 286-298 u. 340-346 (1953)

FEIGL, F., V. ANGER u. O. FREHDEN: Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen (II); Mikrochemie 15, 9-12 (1934)

FISCHER, N.H., R.A. WILEY u. D.L. PERRY: Rev. Latinoam. Quim. (1976), zitiert nach E. RODRIGUEZ et al.: Biological activities of sesquiterpene lactones; Phytochemistry 15, 1573-1580 (1976)

FISCHER, N.H., E.J. OLIVIER u. H.D. FISCHER: The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones; in: L. ZECHMEISTER: Progress in the chemistry of organic natural products 38, Springer Verlag, Wien, New York (1979)

FORST, A.W.: Zur Wirkung von Arnica montana auf den Kreislauf; Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 201, 243 (1943)

FRIEBEL, B.: Neue Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montana L. und ihre Wirkung; Dissertation, Marburg (1972)

FROHNE, D. Anatomisch-mikrochemische Drogenanalyse; 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

GEISSMAN, T.A.: The biogenesis of sesquiterpene lactones of the Compositae; in: Recent advances in phytochemistry 6, 65-95, Academic Press, New York/London (1973)

GEISSMAN, T.A. u. T.S. GRIFFIN: Sesquiterpene lactones: Acid catalysed color reaction as an aid in structure determination; Phytochemistry 10, 2475-2485 (1971)

GEßNER, O.: Pharmakologie der Arnica montana L.; Med. Monatsschr. 3, 825-828 (1949)

GEßNER, O. u. G. ORZECHOWSKI: Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa; Universitätsverlag Carl Winter, Heidelberg (1974)

GÜNTHER, H.: NMR-Spektroskopie; Thieme Verlag, Stuttgat (1973)

GULLINO, P.M. u. Y.S. CHO-CHUNG: In vivo inhibition of growth of two hormone-dependent mammary tumors by dibutyryl cyclic AMP; Science 183, 87-88 (1974)

HALL, I.H., K.H. LEE, E.C. MAR u. C.O. STARNES: Antitumor agents 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by Tenulin and Helenalin and related cyclopentenones; J. Med. Chem. 20, 333-337 (1977)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, S.A. EIGEBALY, T. IBUKA, Y.S. WU, T. KIMURA u. M. HARUNA: Antitumor agents XXX: Evaluation of a α-Methylene-γ-lactone-containing agents for inhibition of tumor growth, respiration and nucleic acid synthesis; J. Pharm. Sci. 67, 1235-1239 (1978)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, Y. SUMIDA, R.Y. WU, T.G. WADDELL, J.W. COCHRAN u. K.G. GERHART: Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds J. Pharm. Sci. 68, 537-542 (1979)

HALL, I.H., K.H. LEE, W.L. WILLIAMS, T. KIMURA u. T. HIRAYAMA: Antitumor agents XLI: Effects of Eupaformosanin on nucleic acid, protein and anaerobic and aerobic glycolytic metabolism of Ehrlich-ascites cells; J. Pharm. Sci. 69 (3), 294-297 (1980)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES u. T.G. WADDELL: Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents; J. Pharm. Sci. 69 (5) 537-543 (1980)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, O. MURAOKA, Y. SUMIDA u. T.G. WADDELL: Antihyperlipidemic activity of sesquiterpene lactones and related compounds; J. Pharm. Sci. 69 (6), 694-697 (1980)

HARTWELL, J.L. u. B.J. ABBOTT: Antineoplastic principles in plants. B. Sesquiterpene lactones; Adv. in Pharmacol. Chemother. 7, 145-154 (1969)

HAUSEN, B.M.: Arnikaallergie; Der Hautarzt 31, 10-17 (1980)

HAUSEN, B.M., H.D. HERRMANN u. G. WILLUHN: The sensitizing capacity of Compositae plants - I. Occupational contact dermatitis from Arnica longifolia Eaton; Contact Dermatitis 4, 3-10 (1978)

HAYNES, L.J.: Physiologically active unsaturated lactones; Quart. Rev. 2, 46-61 (1948)

HEGENAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 3; Birkhäuser Verlag, Basel/Stuttgart (1964)

HEROUT, V.: Taxonomisches Merkmal der Compositae; Planta Med. 14, 97-106 (1966a)

HEROUT, V.: Beitrag zur Chemotaxonomie der Familie der Compositae; Herba Hung. 5, 95-99 (1966b)

HEROUT, V.: Chemotaxonomy of the family Compositae (Asteraceae); in: Pharmacognosy and phytochemistry; Springer Verlag, Heidelberg/New York (1971)

HEROUT, V. u. F. SORM: Chemotaxonomy of the sesquiterpenoids of the Compositae; in: Perspectives in phytochemistry; Academic Press, London/New York (1969)

HERRMANN, H.D.: Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica longifolia Eaton und ihre Wirkungen; Dissertation, Düsseldorf (1978)

HERRMANN, H.D., G. WILLUHN u. B.M. HAUSEN: Helenalinmethacrylate, a new pseudoguaianolide from the flowers of Arnica montana L. and the sensitizing capacity of their sesquiterpene lactones; Planta Med. 34, 299-304 (1978)

HERZ, W.: Pseudoguaianolides in Compositae; in: Recent advances in phytochemistry 1, 229-269, New York (1968)

HERZ, W.: Sesqiterpene Lactones in Compositae; in: Pharmacognosy and phytochemistry; Springer Verlag, New York (1971)

HERZ, W.: Pseudoguaianolides in Compositae; in: Chemistry in botanical classification; Nobel Symposia 25, 153-172 (1973)

HERZ. W., A. ROMO DE VIVAR, J. ROMO u. N. VISWANATHAN: Constituents of Helenium species - XV. The structure of Mexicanin C. Relative stereochemistry of its congeners; Tetrahedron 19, 1359-1369 (1963)

HERZ, W., K. AOTA, A.L. HALL u. A. SRINIVASAN: Antileukemic pseudoguaianolides from Hymenoxys grandiflora (T. & G.) Parker. Application of lanthanide-induced shifts to structure determination; J. Org. Chem. 39, 2013-2018 (1974)

HERZ, W., R. MURARI u. S.V. GOVINDAN: Sesquiterpene lactones of Eupatorium anomalum and Eupatorium mohrii; Phytochemistry 18, 1337-1341 (1979)

HESSE, M., H. MEIER u. B. ZEEH: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

HLADON, B., B. DROZDZ, M. HOLUB u. T. BOBKIEWICZ: Sesquiterpene lactones XVI. In vitro studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissue cultures of human and animal malignant cells; Arch. Immunol. Ther. Exp. 23, 845-855 (1975)

IMAKURA, Y., K.H. LEE, D. SIMS, R.-Y. WU, I.H. HALL, H. FURUKAWA, M. ITOIGAWA u. K. YONAHA: Antitumor agents XXXVI: Structural elucidation of sesquiterpene lactones Microhelenins-A, B and C, Microlenin Acetate and Plenolin from Helenium microcephalum; J. Pharm. Sci. 69,1044-1049 (1980)

IVIE, G.W., D.A. WITZEL, W. HERZ, R. KANNAN, J.O. NORMAN, D.D. RUSHING, J.H. JOHNSON, L.D. ROWE u. J.A. VEECH: Hymenovin. Major toxic constituent of Western Bitterweed (Hymenoxys odorata DC.); J. Agric. Food Chem. 23, 841-845 (1975a)

IVIE, G.W., D.A. WITZEL u. D.D. RUSHING: Toxicity and milk bittering properties of Tenulin, the major sesquiterpene lactone constituent of Helenium amarum (Bitter Sneezeweed); J. Agric. Food Chem. 23, 845-849 (1975b)

JONES, J.B. u. J.M. YOUNG: Carcinogenicity of lactones. III. The reaction of unsaturated γ-lactones with L-Cysteine; J. Med. Chem. 11, 1176-1182 (1968)

KAVANAGH, F.: Analytical microbiology; Academic Press, New York/London (1963)

KIM, H.L.: Toxicity of sesquiterpene lactones; Res. Com. Chem. Path. Pharmacol. 28, 189-192 (1980)

KONDO, Y., T. TOMIMORI, N. HIRAGA u. T. TAKEMOTO: Picrohelenin, a new cytotoxic and bitter pseudoguaianolide from Sendai Helenium autumnale L.; Heterocycles 6, 301-306 (1977)

KORTE, F., H. BARKEMEYER u. I. KORTE: Neuere Ergebnisse der Chemie pflanzlicher Bitterstoffe; in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 17, 125-151 (1959)

KREBS, H.A. u. K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-36 (1932)

KREITMAIR, H.: Arnica montana - der Bergwohlverleih; Pharmazie 7, 441-444 (1952)

KUPCHAN, S.M., S.M. EAKIN u. A.M. THOMAS: Tumor inhibitors 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones; J. Med. Chem. 14, 1147-1152 (1971)

KUPCHAN, S.M.: Advances in the chemistry of tumor-inhibitory natural products; in: Recent advances in phytochemistry 9, 168-187, Plenum Press, New York/London (1975)

LABADIE, R.P.: Arnica montana L.; Pharm. Weekbl. 103, 769-774 (1968)

LAMSON, P.D.: On the pharmacological action of Helenalin, the active principle of Helenium autumnale; J. Pharmacol. Exptl. Therap. 4, 471-489 (1913)

LEE, K.H., D.C. ANUFORO, E.S. HUANG u. C. PIANTADOSI: Antitumor agents I: Angustibalin, a new cytotoxic sesquiterpene lactone from Balduina angustifolia (Pursh.) Robins; J. Pharm. Sci. 61, 626-628 (1972)

LEE, K.H., H. FURUKAWA u. E.S. HUANG: Antitumor agents. 3. Synthesis and cytotoxic activity of Helenalin amine adducts and relate derivatives; J. Med. Chem. 15, 609-611 (1972)

LEE, K.H., R. MECK, C. PIANTADOSI u. E.S. HUANG: Antitumor agents. 4. Cytotoxicity and in vivo activity of Helenalin esters and related derivatives; J. Med. Chem. 16, 299-301 (1973)

LEE, K.H., T. IBUKA, A.T. McPHAIL, K.D. ONAN, T.A. GEISSMAN u. T.G. WADDELL: The structure and absolute configuration of Plenolin, a cytotoxic sesquiterpene lactone; Tetrahedron Letters 13, 1149-1152 (1974)

LEE, K.H., Y. IMAKURA, D. SIMS, A.T. McPHAIL u. K.D. ONAN: Antitumor sesquiterpene lactones from Helenium microcephalum: Isolation of Mexicanin-E and structural characterisation of Microhelenin-B and C; Phytochemistry 16, 393-395 (1977)

LEE, K.H., I.H. HALL, E.C. MAR, C.O. STARNES, S.A. EIGEBALY, T.G. WADDELL, R.I. HADGRAFT, C.G. RUFFNER u. I. WEIDNER: Sesquiterpene antitumor agents: Inhibitors of cellular metabolism; Science 196, 533-536 (1977a)

LEE, K.H., T. IBUKA, R.-Y. WU u. T.A. GEISSMAN: Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds; Phytochemistry 16, 1177-1181 (1977b)

LEE, K.H., M. HARUNA, H.C. HUANG, B.S. WU u. I.H. HALL: Antitumor agents XXIII: Helenalin, an antitumor principle from Anaphalis morrisonicola HAY.; J. Pharm. Sci. 66, 1194-1195 (1977c)

LEE, K.H., T. IBUKA, D. SIMS, O. MURAOKA, H. KIYOKAWA, I.H. HALL u. H.L. KIM: Antitumor agents. 44. Bis(helenalinyl) esters and related derivates as novel potent antileukemic agents; J. Med. Chem. 24, 924-927 (1981)

LIST, P.H. u. B. FRIEBEL: Neue Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montana L.; Arzneim.-Forschung 24, 148-151 (1974)

LIST, P.H. u. L. HÖRHAMMER: Arnica; Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, vollst. 4. Neuausgabe, 214-233, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1972)

LITCHFIELD, J.T. u. F.W. WILCOXON: Simplified methods for evaluating dose-effects experiments; J. Pharmacol. Exptl. Therap. 96, 99-113 (1949)

LOEV, B. u. M.M. GOODMAN: Dry-column chromatography: A preparative chromatographic technique with the resolution of thin-layer chromatography; Chem. Ind. (London) 2026-2032 (1967)

MABRY, T.J. u. F. BOHLMANN: Biology and chemistry of the Compositae; Bd. 1 u. 2; Academic Press, New York (1977)

MALKINSON, A.M. u. W.C. SHERE: Decreased pentobarbital sleeptime following a single intraperitoneal injection of cedar-derived sesquiterpenes; Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 25, 607-610 (1979)

McPHAIL, A.T. u. K.D. ONAN: Structure and absolute configuration of Plenolin: X-ray analysis of Plenolin p-iodobenzoate; J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 487-492 (1975)

MENGE, F. u. P. HERRMANN: Die gebräuchlichsten homöopathischen Mittel 14. Arnica montana; Heilkunst 66A, 130-132 (1953)

MITCHELL, J.C.: Contact allergy from plants; in: Recent advances in phytochemistry 9, 119-138, Plenum Press, New York/London (1975)

MITSCHER, L.A.: Antimicrobial agents from higher plants; in: Recent advances in phytochemistry 9, 243-282, Plenum Press, New York/london (1975)

MITZNEGG, P.: Erfolge der Phytotherapie. Molekulare Angriffspunkte kardiotroper Pflanzenwirkstoffe; in: L. DEMLING. TH. NASEMANN u. W. RÖNSCH (Hrsgb.): Erfahrungstherapie, späte Rechtfertigung. Internationales Symposium, Wien, 1975, Verlag C. Braune, Karlsruhe (1975)

NEHER, R.: Steroid chromatography; S. 126 (5c); Elsevier Publishing Company, Amsterdam/London/New York (1964)

OLECHNOWICZ-STEPIEN, W. u. S. STEPIEN: In vitro and in vivo studies on the activity of Helenine and its components against some species of dermatophytes; Diss. Pharm. 15, 17-22 (1963)

PEREIRA, J.R.: On the action of Arnica upon the blood pressure and respiration in dogs; Amer. J. Physiol. 90, 469 (1929)

PERRY, S.V.: Phosphorylation and the regulation of the function of Myosin and Troponin complex; Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 380 (1975)

PETTIT, G.R. u. G.M. CRAGG: Antineoplastic agents 32. The pseudoguaianolide Helenalin; Experientia 29, 781 (1973)

PETTIT, G.R., J.C. BUDZINSKI, G.M. CRAGG, P. BROWN u. L.D. JOHNSTON: Antineoplastic agents 34. Helenium autumnale; J. Med. Chem. 17, 1013-1016 (1974)

PEYER, W.: Über Tinctura Arnicae; Apotheker Ztg. 81, 1237-1238 (1927)

PICMAN, A., R. RANIERI u. G.H.N. TOWERS: Insect feeding deterrent property of Alantolactone; Biochem. Syst. Ecol. 6 (4), 333-335 (1978)

PICMAN, A., R. RANIERI, G.H.N. TOWERS u. J. LAM: Visualization reagents for Sl and polyacetylenes on thin-layer chromatograms; J. Chrom. 189, 187-198 (1980)

POPLAWSKI, J., M. HOLUB, Z. SAMEK u. V. HEROUT: On terpenes. CCIX. Arnicolides-sesquiterpenic lactones from the leaves of Arnica montana L.; Coll. Czech. Chem. Comm. 36, 2189-2199 (1971)

POSTERNAK, T.: Cyclic AMP and cyclic GMP; Ann. Rev. Pharmacol. 14, 23-34 (1974)

PRETSCH, E., T. CLERC, J. SEIBL u. W. SIMON: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1976)

QUACK, W.: Merulinsäure A, B und C und Merulidial, neue Antibiotika aus Basidiomyceten; Dissertation, Tübingen (1978)

RODRIGUEZ, E., G.H.N. TOWERS u. J.C. MITCHELL: Biological activities of sesquiterpene lactones; Phytochemistry 15, 1573-1580 (1976)

RODRIGUEZ, E., H. YOSHIOKA u. T.J. MABRY: The sesquiterpene lactone chemistry of the genus Parthenim (Compositae); Phytochemistry 10, 1145-1154 (1971)

RUDZKI, E. u. Z. GRZYWA: Dermatitis from Arnica montana; Contact Dermatitis 3, 281-282 (1977)

RÜCKER, G.: Über biologische Eigenschaften von Sesquiterpenen; Deutsche Apotheker Ztg. 113, 1291-1294 (1973)

RYBALKO, K.S., E.A. TRUTNEW u. B.N. KIBALTSCHITSCH: Über eine kristalline Substanz aus Arnica foliosa; Aptetschnoje Delo 14, 32-33 (1965)

SCHELENZ, C.: Geschichtliches über Vergiftung mit Arnika; Muench. Med. Wochenschr. 85, 1791-1792 (1938)

SCHILCHER, H.: Qualitätsprüfung von Handelsdrogen; Deutsche Apotheker Ztg. 105, 1067-1072 (1965)

SCHLEICHER, H.: Überphytogene allergische Kontaktekzeme; Dermatol. Monatsschr. 160, 433-444 (1974)

SCHOENEMANN, H.: Vergiftungen mit Tee aus Arnikablüten; Muench. Med. Wochenschr. 85, 787-788 (1938)

SCHULZ, H.: Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen; Leipzig (1929)

SCHULZ, K.H., B.M. HAUSEN, L. WALLHÖFER u. P. SCHMIDT-LÖFFLER: Chrysanthemen-Allergie. 2. Experimentelle Untersuchungen zur Identifizierung der Allergene; Arch. Derm. Forsch. 251, 235-244 (1975)

SETH, S.C. u. M. BHATIA: Cardiovascular effects of Parthenin; J. Molec. Cell. Card. 10 (Supp. I), 100 (1978)

SORM, F. u. L. DOLJES: Guaianolides and Germacranolides; Hermann, Paris (1965)

SPERRY, O.E., J.W. DOLLAHITE, G.O. HOFFMANN u. B.J. CAMP: Texas plants poisonous to livestock; Texas A&M University, College Station (1964)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1962)

STEELINK, C. u. J.C. SPITZNER: Sesquiterpene lactones in chemotaxonomy; Phytochemistry 5, 357-365 (1966)

STUHLFAUTH, K.: Die Arnika im Tierversuch; Dissertation, München, 1936; s.a. Hippokrates 9, 1131 (1938)

THIES, H.: Pharm. Ind. 10, 289 (1943); zitiert nach B. FRIEBEL: Neue Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montan L. und ihre Wirkungen; Dissertation, Marburg (1972)

TSAI, L., J. HIGHET u. W. HERZ: The mass spectra of pseudoguaianolides related to Helenalin; J. Org. Chem. 34, 945-948 (1969)

TURK: J. connais. Med. chir. (1853); zitiert nach H. KREITMAIR: Arnica montana - Bergwohlverleih; Pharmazie 7, 441-444 (1952)

WATSON, W.H., M.G. REINECKE u. J.C. HITT: Rev. Latinoamer. Quim. 6, 1 (1975); zt. nach E. RODRIGUEZ: Biological activities of sesquiterpene lactones; Phytochemistry 15, 1573-1580 (1976)

WIEBKE, M., J. KRESKEN, D. MOOTZ u. G. WILLUHN: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis LESS.: Röntgenstrukturanalyse von Chamissonolid; in Vorbereitung

WILLIAMS, D.H. u. I. FLEMING: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung; Thieme Verlag, Stuttgart (1975)

WILLUHN, G.: Die Arnika - ein Beispiel gegenwärtiger pharmakognostischer Forschung; Der informierte Apotheker 1, 213-224 (1973)

WILLUHN, G.: Neuere Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica montana L.; Physikalische Medizin und Rehabilitation; 16, 46-49 (1975)

WILLUHN, G.: Neue Ergebnisse der Arnikaforschung; Pharmzie in unserer Zeit 10, 1-7 (1981)

WILLUHN, G. u. H.D. HERRMANN: Zwei Sesquiterpenlactone aus den Blüten von Arnica longifolia; Arch. Pharm. 309, 333-335 (1976)

WILLUHN, G. u. H.D. HERRMANN: Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Arnikablüten und Arnikatinktur (DAB 7) anhand ihrer Sesquiterpenlactone; Pharm. Ztg. 123, 1803-1808 (1978)

WILLUHN, G. u. H.D. HERRMANN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten; Planta Med. 37, 325-332 (1979)

WILLUHN, G. u. P.-M. RÖTTGER: Heterotheca inuloides Cass., die "Mexikanische Arnica"; Deutsche Apotheker Ztg. 120, 1039-1042 (1980)

WILLUHN, G., G. PRETZSCH u. D. WENDISCH: Zwei neue Pseudoguaianolide aus den Blüten von Arnica chamissonis Less. Subsp. genuina Magiure; Tetrahedron 37, 773-776 (1981)

WITZEL, D.A., G.W. IVIE u. J.W. DOLLAHITE: Mammalian Toxicity of Helenalin, the toxic principle of Helenium microcephalum DC (Smallhead Sneezeweed); Am. J. Vet. Res. 37, 859-861 (1976)

YOSHIOKA, H., T.J. MABRY, N. DENNIS u. W. HERZ: Structure and stereochemistry of Pulchellin B, C, E and F; J. Org. Chem. 35, 627-630 (1970)

YOSHIOKA, H., T.J. MABRY u. B.N. TIMMERMANN: Sesquiterpene lactones: Chemistry, NMR and plant distribution; University of Tokyo Press, Tokyo (1973)

ZÄHNER, H.: Biologie der Antibiotika ; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1965)

Lebenslauf

Am 04-08-1951 wurde ich, Peter-Michael Röttger, in Berlin geboren. Meine Eltern sind die Zahnärzte Hans-Joachim Röttger und Dr. Jutta Röttger, geb. Henke. Meine ersten Lebensjahre verbrachte ich wegen des Studiums meiner Eltern in Görlitz bei meinen Großeltern, wo ich auch 1957 in die erste Klasse der Volksschule eingeschult wurde. Nach meiner Rückkehr nach Berlin, 1958, absolvierte ich in Berlin-Zehlendorf die restlichen Grundschuljahre, bis ich Ostern 1961 in das Humanistische Heese-Gymnasium, Berlin-Steglitz, überwechselte.

Nach dem Umzug meiner Eltern nach Bayern besuchte ich von Herbst 1961 bis zum Abitur im Juni 1970 das Augustinus Gymnasium in Weiden/Opf. Von September 1970 bis Juni 1972 war ich als Praktikant in der Dr. Wildi's Apotheke in Rottach-Egern tätig, bestand im Juni 1972 die pharmazeutische Vorprüfung in München und nahm dort im Sommersemester 1973 das Pharmaziestudium auf. Nach sieben Semestern bestand ich am 21-10-1976 die Pharmazeutische Staatsprüfung und erhielt am 03-12-1976 meine Approbation als Apotheker durch das Bayerische Innenministerium.

Nach zweijähriger Tätigkeit in öffentlichen Apotheken im süddeutschen Raum begann ich auf Anregung und unter Leitung von Professor Dr. G. Willuhn am 01-10-1978 im Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Seit 01-01-1979 verwalte ich dort eine wissenschaftliche Assistentenstelle, nachdem ich zuvor als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt war.

Seit dem 03-08-1973 bin ich mit der Apothekerin Friederike Röttger, geb. Lutterbeck, verheiratet. Aus dieser Ehe habe ich einen Sohn (1975) und eine Tochter (1977).

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren
Eiden, Glasl, Hölzl, Hörhammer, Kallinich, Kurz, Lippold, Rupprecht, Schönenberger, Stachel, Ullmann, Wagner, Willuhn.